



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

## **Actividad inhibitoria de los aceites esenciales de *Lippia alba* contra el virus zika en células VERO – 76 y C6/36 de *Aedes albopictus***

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Zoología

### **AUTOR**

Bernardo Esteban QUISPE BRAVO

### **ASESOR**

Egma Marcelina MAYTA HUATUCO

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Quispe, B. (2018). *Actividad inhibitoria de los aceites esenciales de Lippia alba contra el virus zika en células VERO – 76 y C6/36 de Aedes albopictus*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA ✓  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

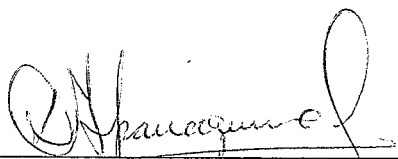
Siendo las ..8:32..... horas del 11 de octubre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Zoología** de **BERNARDO ESTEBAN QUISPE BRAVO**. ✓

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 029-EPCB-2017, el titulando expuso su tesis: **“ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba* CONTRA EL VIRUS ZIKA EN CÉLULAS VERO-76 Y C6/36 DE *Aedes albopictus*”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ..18.. , calificativo: *Aprobado con mención honoraria*

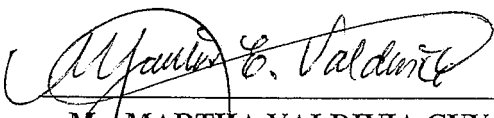
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Zoología** a **BERNARDO ESTEBAN QUISPE BRAVO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

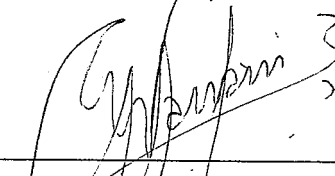
Siendo las ..10:10..... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 11 de octubre de 2018.

  
Mg. DOMINGO IPARRAGUIRRE LEON  
(PRESIDENTE)

  
Dra. EGMA MAYTA HUATUCO  
(ASESORA)

  
Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA  
(MIEMBRO)

  
Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA  
(MIEMBRO)



## **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada en primer lugar a Vilma Bravo, mi madre, porque con sus consejos y palabras de ánimos me incentivó a culminar esta tesis; en segundo lugar, agradecer a mi padre por apoyarme incondicionalmente y por darme consejos muy valiosos que me permitieron conocerlo aún más; a mi hermana por apoyarme en la parte logística de mi vida; a mi familia porque de alguna u otra manera me ayudaron en el desarrollo de mi tesis. Les agradezco por su paciencia y comprensión. Por último, agradecer a Dios por cruzarme y dejarme conocer a todas estas excelentes personas en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Egma Marcelina Mayta Huatuco por brindarme la oportunidad de realizar la tesis y ser una buena asesora.

Al Dr. Enrique Walter Mamani Zapana por aconsejarme e incentivarme a seguir adelante hasta culminar mis objetivos y por facilitarme el uso de sus equipos que tiene a cargo en el laboratorio de Virología Clínica y Molecular.

Al Blgo. Juan Samuel Sulca Herencia, quien es un buen profesor y amigo, le agradezco porque fue fundamental en la culminación y revisión de mi tesis en la parte de cultivo celular y por orientarme en el manejo de líneas celulares.

A la PhD. Maria Elena González Romero, quien es una buena profesional y excelente persona, le agradezco por su sencillez al momento de enseñarme durante su estancia en el laboratorio de Virología Clínica y Molecular; además, le agradezco por ayudarme y asesorarme en la metodología de extracción del aceite esencial de *Lippia alba*.

A la Blga. Betty Elena Shiga Oshige por facilitarme el uso de equipos para el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Durigón del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo le agradezco por la donación de la semilla viral de ZIKV.

Por último, agradecer a mis compañeros, amigos y colegas de la facultad: A Gloria por sus acertados consejos y por presionarme semanalmente para culminar esta tesis; A Joe Hermosilla por ayudarme con la técnica de diagnóstico por RT – PCR (Tiempo Real) de ZIKV; A Lucas Sevilla, Karla Vásquez y Adrián Bedoya por apoyarme desde mis inicios en el laboratorio y en el desarrollo de mi tesis; y, a los que se fueron incorporando durante el desarrollo de mi tesis como Patrick González, Nora Taipe, Ingrid Llashay, Stefanny Valdiviano, Harumy Rojas, Eduardo Urbano, Nicolle Pereira, Lucero Álvarez, Alys Chávez y a los nuevos integrantes del laboratorio; gracias por el apoyo brindado. Por último, agradecer a Arturo Liñan Torres por el intercambio de información con respecto a ZIKV.

## **ABREVIATURAS**

<b>°C</b>	<b>Grado (s) Celsius.</b>
<b>3+</b>	<b>Tres cruces.</b>
<b>AE</b>	<b>Aceite esencial.</b>
<b>CC</b>	<b>Control de células.</b>
<b>cm</b>	<b>Centímetro (s).</b>
<b>C<sub>n</sub></b>	<b>Control (n).</b>
<b>CV</b>	<b>Control de virus.</b>
<b>d<sub>n</sub></b>	<b>dilucion “n”.</b>
<b>ECP</b>	<b>Efecto citopático.</b>
<b>gr</b>	<b>Gramo (s).</b>
<b>hr(s)</b>	<b>Hora (s).</b>
<b>m</b>	<b>metros</b>
<b>MC</b>	<b>Medio de crecimiento.</b>
<b>mg</b>	<b>miligramo (s)</b>
<b>min (s)</b>	<b>Minuto (s).</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitro (s).</b>
<b>MM</b>	<b>Medio de mantenimiento.</b>
<b>MNTD</b>	<b>Dosis no tóxica máxima</b>
<b>PIRP</b>	<b>Prueba de inhibición de reducción de placas.</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto.</b>
<b>TIA</b>	<b>Tasa de incidencia acumulada</b>
<b>UFP</b>	<b>Unidad formadora de placa.</b>
<b>WSV</b>	<b>Solución viral de trabajo.</b>
<b>ZIKV</b>	<b>Virus Zika.</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramos</b>
<b>µl</b>	<b>Microlitro (s).</b>

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	8
	a. PLANTAS ANTIVIRALES .....	8
	1. Importancia.....	8
	2. Plantas con propiedades antivirales probados en otros virus.....	8
	b. <i>Lippia alba</i> .....	9
	1. Ubicación taxonómica .....	9
	2. Sinónimos .....	9
	3. Distribución .....	9
	4. Descripción.....	9
	5. Importancia etnobotánica .....	9
	c. ACEITE ESENCIAL.....	10
	1. Definición .....	10
	2. Principales usos de los aceites esenciales .....	10
	3. Técnica de hidrodestilación .....	10
	d. VIRUS DEL ZIKA.....	11
	1. Definición .....	11
	2. Historia.....	11
	3. Clasificación .....	12
	4. Estructura.....	12
	5. Genotipo del Virus Zika (ZIKV) .....	12
	6. Ciclo de replicación viral.....	13
	7. Epidemiología .....	14
	8. Vectores y los tipos de transmisión del virus Zika.....	15
	9. Impacto social y prevención .....	15
	10. Vacunas .....	15
	e. CULTIVO CELULAR.....	16
	1. Definición .....	16
	2. Tipos de cultivo celulares.....	16
	3. Tipo de crecimiento celular .....	17
	4. Condiciones importantes para el cultivo de células .....	17
	5. Agentes de dispersión celular.....	19
	6. Conservación de células.....	19
	7. PRNT.....	19

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
a. PROBLEMA.....	20
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
V. OBJETIVO.....	22
a. OBJETIVO PRINCIPAL.....	22
b. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	22
VI. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN .....	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
a. MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
b. MATERIAL DE LABORATORIO. ....	23
1. Reactivos.....	23
2. Material. ....	23
3. Equipo.....	24
c. MÉTODOS. ....	25
1. Colecta de <i>Lippia alba</i> . ....	25
2. Extracción de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....	25
3. Obtención, estandarización y producción de semilla viral de Zika en VERO – 76 y C6/36. ....	27
4. Citotoxicidad del extracto de aceite esencial de <i>Lippia alba</i> en la línea celular VERO y C6/36 .....	29
5. Prueba de inhibición por reducción de placas para ZIKV.....	31
6. Procesamiento estadístico.....	32
VIII. RESULTADOS. ....	33
1. Extracción de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....	33
2. Estandarización y producción de semilla viral de Zika en VERO. ....	33
2.1. Obtención del suero .....	33
2.2. Identificación y pureza del virus .....	33
2.3. Producción de ZIKV en línea celular VERO – 76.....	35
2.4. Titulación de ZIKV en línea celular VERO -76.....	37
3. Citotoxicidad del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> en la línea celular VERO – 76. ....	40
4. Prueba de inhibición de reducción de placas .....	43
IX. DISCUSIONES .....	48
X. CONCLUSIONES.....	53
XI. RECOMENDACIONES .....	54
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
XIII. ANEXOS.....	69

<b>a. Figuras.....</b>	<b>69</b>
<b>b. Tablas:.....</b>	<b>88</b>
<b>b.1. Preparación de reactivos .....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Extracción en crudo del aceite esencial de la muestra total de *Lippia alba*

**Tabla 2.** Adaptabilidad del virus Zika (ZIKV) en la línea celular VERO – 76

**Tabla 3.** Tiempo de propagación de ZIKV en las líneas celulares VERO – 76 y C6/36

**Tabla 4.** Cinética de ZIKV en la línea celular VERO – 76

**Tabla 5.** Titulación de ZIKV en la línea celular VERO - 76

**Tabla 6.** Evaluación de la citotoxicidad en base a la monocapa celular

**Tabla 7.** Inhibición contra ZIKV

**Tabla 8:** Porcentaje de inhibición de M1 y M2

**Tabla 9:** Fórmula de preparación del medio de crecimiento

**Tabla 10:** Fórmula de preparación del medio de mantenimiento

**Tabla 11:** Fórmula de preparación del overlay (medio semisólido)

**Tabla 12:** Fórmula de preparación del overlay (medio sólido)

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Lugar de colecta.
- Figura 2:** GPS Status & Toolbox.
- Figura 3:** Constancia de identificación de la planta.
- Figura 4:** Voucher de *Lippia alba*.
- Figura 5:** Sistema de hidrodestilación.
- Figura 6:** Material Vegetal en el balón esmerilado.
- Figura 7:** Extracción del aceite esencial de *Lippia alba*.
- Figura 8:** Separación del aceite esencial de *Lippia alba*.
- Figura 9:** Almacenamiento.
- Figura 10:** Identificación y amplificación de la extracción de ZIKV por medio de la técnica de RT – PCR (Tiempo Real).
- Figura 11:** Día 0 (cero) de infección de ZIKV en las líneas celulares C6/36 *Aedes albopictus* y VERO – 76.
- Figura 12:** Línea celular VERO – 76: Control de células y ECP 3+.
- Figura 13:** Línea celular C6/36: Control de células y ECP 3+.
- Figura 14:** Concentración de partículas virales utilizando una concentración de  $1.25 \times 10^5$  cel/ml.
- Figura 15:** Titulación viral a distintas concentraciones de células usando el método sólido.
- Figura 16:** Método sólido: Tamaño y forma de la placa.
- Figura 17:** Coloración del día óptimo de titulación del ZIKV.
- Figura 18:** Titulación de la semilla viral de ZIKV propagado previamente en las líneas celulares VERO – 76 y C6/36.
- Figura 19 – a:** Titulación de ZIKV en línea celular VERO – 76 usando el método semi – sólido.
- Figura 19 – b:** Titulación de ZIKV en línea celular VERO – 76 usando el método sólido.



- Figura 20:** Gráfica de citotoxicidad del aceite esencial de *Lippia alba* en líneas celulares VERO – 76 y C6/36.
- Figura 21:** Placa de citotoxicidad en VERO – 76 y C6/36.
- Figura 21 – a:** Placa de citotoxicidad en VERO – 76.
- Figura 21 – a1:** Pozos de control de células VERO – 76, Control de tween 80 – etanol – AE, Control de tween 80 – etanol, Control de AE.
- Figura 21 – a2:** Pozo citotóxico y no citotóxico en VERO – 76.
- Figura 21 – b:** Placa de citotoxicidad en C6/36.
- Figura 21 – b1:** Pozos de control de células C6/36, Control de tween 80 – etanol – AE, Control de tween 80 – etanol, Control de AE.
- Figura 21 – b2:** Pozo citotóxico y no citotóxico en C6/36.
- Figura 22** Prueba de inhibición de reducción de placas del extracto de aceite esencial contra ZIKV usando la línea celular VERO – 76.
- Figura 23:** Evaluación de la prueba de inhibición de reducción de placas de la mezcla 1 y la mezcla 2 contra ZIKV
- Figura 23 – 1:** Inhibición de la mezcla tween 80, etanol y aceite esencial de *Lippia alba* contra ZIKV V
- Figura 23 – 2:** Inhibición de la mezcla tween 80 y etanol contra ZIKV
- Figura 23 – 3:** Pozo de CC, WSV, CV,  $CV^{-1}$  y  $CV^{-2}$
- Figura 24:** Gráfica de la prueba de inhibición de reducción de placas (PRNT) contra ZIKV.
- Figura 25:** Porcentaje de inhibición de ZIKV de las muestras M1 y M2.

## RESUMEN

El virus Zika es un flavivirus emergente que en los últimos 2 años causó una serie de problemas de salud y económicas en América Latina; afectando con mayor severidad a los recién nacidos. Por ello, evaluamos la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de la planta aromática (verbenaceae) *Lippia alba* en la línea celular VERO – 76 y C6/36. *Lippia alba* se colectó en el departamento de Amazonas y se identificó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM. La extracción del aceite esencial total de la planta entera de *Lippia alba* fue realizada mediante un equipo de hidrodestilación por arrastre de vapor usando un aparato de tipo cleverger y almacenada dentro de un frasco oscuro a 4°C. El virus Zika fue donado por el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo y analizado mediante RT – PCR (Tiempo Real). *In vitro* se propagó el virus Zika en la línea celular C6/36 *Aedes albopictus*; una vez cosechada la semilla viral se halló el título viral a  $9.8 \times 10^6$  UFP/ml. de ZIKV. El aceite esencial se probó en las líneas celular C6/36 y VERO – 76 para determinar el  $CC_{50}$  con 400.8  $\mu\text{g/ml}$  y 167  $\mu\text{g/ml}$ , respetivamente. Finalmente, se determinó  $PIRP_{75}$  a una concentración de 13.36  $\mu\text{g/ml}$ . En conclusión, el extracto de *Lippia alba* presenta actividad antiviral contra virus Zika.

**PALABRAS CLAVE:** *Lippia alba*, ZIKV, Línea celular,  $CC_{50}$  ,  $PIRP_{75}$  .

## ABSTRACT

Zika virus is an emerging flavivirus that in the last 2 years caused a series of health and economic problems in Latin America; affecting newborns more severely. Therefore, evaluate the inhibitory activity of the essential oils of the aromatic plant (verbeneceae) *Lippia alba* in the cell lines VERO – 76 and C6/36. *Lippia alba* was collected in the department of Amazonas and identified in the Natural History Museum of the UNMSM. The extraction of the total essential oil from the whole plant of *Lippia alba* was carried out by means of a hydrodistillation equipment using a Clevenger – type apparatus and stored in a dark bottle at 4°C. The Zika virus was donated by the Laboratory of Clinical and Molecular Virology of the University of São Paulo and analyzed by RT – PCR (Real Time). In vitro the Zika virus spread in the C6/36 *Aedes albopictus* cell line; the viral seed was harvested and titled at  $9.8 \times 10^6$  UFP/ml. The essential oil was tested in C6/36 and VERO – 76 cell lines to determine the CC50 with 400.8 µg/ml and 167 µg/ml, respectively. Finally, the PRIT75 was determined at a concentration of 13.36 µg/ml. In conclusion, the use of *Lippia alba* is recommended as a good antiviral against Zika virus.

**KEY WORDS:** *Lippia alba*, ZIKV, cell line, CC<sub>50</sub>, PRIT<sub>50</sub>.

## I. INTRODUCCIÓN.

El virus Zika (ZIKV) fue aislado por primera vez del suero de Mono *Rhesus* centinela en 1947 en el bosque Zika, Uganda (Dick, 1952; González Collantes, 2017) durante un estudio sobre la transmisión de la fiebre amarilla selvática. El segundo aislamiento confirmativo del ZIKV fue recuperado de un pool de mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) en una muestra en 1948 (Dick, 1952; Haddow, 1964; Bell, 1971; González Collantes, 2017). La infección en seres humanos se demostró por estudios serológicos en 1952 (Tanzania y Uganda) (Dick, 1952; Dick et al., 1952; OMS/OPS, 7 mayo de 2015). Solo hasta 1968 se logró aislar el virus a partir de muestras humanas en Nigeria (Moore, 1975; OMS/OPS, 2015).

Sobre la evolución y dispersión del ZIKV en América Latina se ha emitido un informe según OMS/OPS, 2017: En Chile se ha reportado en la Isla de Pascua el primer caso de transmisión autóctona en el 2014 (OMS/OPS, 2015). En Brasil, la Organización Panamericana de Salud emitió la Alerta Epidemiológica de Infección por transmisión autóctona de ZIKV en 18 estados (OMS/OPS, 2015; Song, 2017). A principios del 2016 se emitió una alerta de casos por transmisión autóctona de ZIKV en los países de Centro América y el Caribe (OMS/OPS, 2017; Song, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró, en febrero, la propagación del ZIKV en América Latina mediante la Public Health Emergence of International Concern (PHEIC) (Kindhauser, 2016). En Abril del 2016, se reportó casos de transmisión autóctona de ZIKV en el Perú y en otros países de Sudamérica (OMS/OPS, 2017). Hasta la fecha son 48 países que han confirmado circulación autóctona de ZIKV entre 2015 y 2017 (OMS/OPS, 2017; Song, 2017).

En el Perú, *Aedes aegypti* es el vector transmisor del Dengue, la fiebre de Chikungunya y la enfermedad por ZIKV; se encuentra ampliamente disperso en

21 departamentos, 79 provincias y 385 distritos, donde habitan 18'434,597 personas que están en riesgo de contraer enfermedades. El riesgo de introducción del ZIKV es favorecida por la amplia dispersión del vector; debido: al clima cálido, saneamiento básico insuficiente, déficit de agua potable en las viviendas, entre otros factores (Ministerio de Salud – MINSA, 2016; González Collantes, 2017).

Existieron casos autóctonos confirmados en el 2016 que han sido reportados en Cajamarca, Lima, Tumbes, Loreto, San Martín y Ucayali (OMS/PAHO, 2017). La tendencia de infección por ZIKV tuvo un pico muy alto de incidencia en noviembre del 2016 con 260 casos reportados. En enero del 2017 la mayoría de los casos (731 casos) se concentraron en el departamento de Loreto (OMS/PAHO, 2017). El 63.8% de los casos autóctonos diagnosticados fueron mujeres. La mayor proporción de casos de ZIKV se observó entre los 30 a 59 años (144 casos, 36.7%) seguido del grupo de 18 a 29 años (124 casos, 31.6%) (Aspilcueta-Gho, 2017). La transmisión del ZIKV se concentra en los departamentos de Ica y Loreto (Boletín Epidemiológico del Perú, 2017).

En Perú durante el 2017, el rango de incidencia por ZIKV fue de 20.17 por cada 100 000 habitantes de los cuales se reportaron 60 casos de alumbramientos con madres infectadas en los primeros meses de gestación de los cuales 3 fueron abortos (Boletín Epidemiológico del Perú, 2017) (OMS/PAHO, 2017). Además, durante ese mismo año de los casos por ZIKV y asociación de síndrome congénito fueron confirmados 1 013 casos siendo 22 casos importados. (OMS/OPS, 2017). Por último, según el último Boletín Epidemiológico del Ministerio de Salud (2018), se reportaron desde el primer infectado unos 886 casos confirmados por ZIKV sin ningún fallecido. . La tendencia de infección es ascendente hasta la fecha y la tasa de incidencia acumulada (TIA) de infectados es de cada 2.9 por cada 100 000 habitantes,

siendo el departamento de Amazonas en donde la tasa de incidencia acumulada es más alta con 143 por cada 100 000 habitantes en este año. Además, el 66.2% de personas infectadas a nivel nacional se encuentran entre los 18 y 59 años de edad; siendo el grupo de riesgo entre los 18 a 29 años con una tasa de incidencia específica de 3.64 por cada 100 000 habitantes. Finalmente, el 61.1% de personas infectadas son mujeres de los cuales el 73% se encuentran en edad fértil entre los 12 a 45 años de edad. (Guzmán, 2018).

Hasta la fecha, no se han documentado casos de reinfección por ZIKV porque se considera que la respuesta inmune al virus ofrece protección para toda la vida. Pueden presentarse casos de co-infección por ZIKV y virus Dengue o Chikungunya en un mismo paciente (Boletín Epidemiológico del Perú, 2017).

La infección del ZIKV durante el embarazo puede causar microcefalia y otras malformaciones congénitas. También se le asocia a otras complicaciones del embarazo, como el parto prematuro y el aborto espontáneo (OMS, 2018 & MINSA, 2018). La mayoría de las personas son asintomáticas (45 a 61%) (Cáceres – Mejía, 2018). Los síntomas, generalmente leves duran entre 2 a 7 días, son: fiebre, rash, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestares y cefaleas; además, en niños y adultos el riesgo de infección se manifiestan como complicaciones neurológicas: Síndrome de Guillain Barré, neuropatía y mielitis (Epidemiológica, A, 2015 & OMS, 2018) El diagnóstico puede ser por RT – PCR (tiempo real) aunque puede ocurrir reacción cruzada con otros flavivirus para la detección de anticuerpos, así como viremias de corta duración (Cáceres – Mejía, 2018) En Perú, 535 gestantes fueron ingresadas al sistema de vigilancia de Zika a nivel nacional de las cuales 9 pacientes se encuentran en investigación para determinar asociación entre la infección ZIKV y microcefalia; siendo sus principales hallazgos que en la ecografías cerebrales mostraron signos de calcificación cerebral y ventriculomegalia (MINSA, 2018)

Desde tiempos antiguos, las plantas etnomedicinales fueron usadas para diversas enfermedades incluyendo enfermedades infecciosas. Por ello, es necesario aumentar los estudios para encontrar nuevos componentes antivirales, particularmente de las plantas usadas en prácticas etnomedicinales (Goswami et al, 2016).

*Lippia alba* es un arbusto aromático perteneciente a la familia Verbenaceae, quien es ampliamente usado por todo el Centro y Sur de América para diferentes propósitos. También es una planta muy estudiada en la farmacología (Hennebelle et al., 2008) debido a que se ha identificado componentes químicos de aceites esenciales de *Lippia alba* (Pascual, 2001; Gurgel do Vale, 2002; Zetola, 2002; Vale, 1999). Los nombres locales como cidreira, salvia morada, anís de España, entre otros; son numerosos en América, países de habla hispana, colonias francesas, Australia e India (Hennebelle, 2008); porque son muy usados tradicionalmente, y son generalmente derivados de olores aromáticos o propiedades medicinales (De Abreu Matos et al, 1996). Según datos etnobotánicos, *Lippia alba* conocida como “Prontoalivio” es una planta muy usada para usos digestivos, respiratorios, sedativos y cardiovasculares. También es usado para tratar la anemia, dolor de cabeza, dolores, enfermedades de piel y heridas (Hennebelle, 2008). En el Perú, se encuentra en Amazonas, Huánuco, Lambayeque, Lima, La Libertad, Loreto, Pasco, Pisco, San Martín y Ucayali (Trópicos, 2010; Trópicos, 2011). En Perú; se aislaron e identificaron glucósidos iridoides de *Lippia alba* colectada en Reque, Chiclayo (Higa, 1988). *Lippia alba* tiene como principales componentes activos: flavonoides 4-sulfatos, taninos, geniposidos, triterpenicos, saponinas, resinas, mucilagos, alcaloides, esteroides y como principales aceites esenciales: monoterpenos (Borneol, camphor, 2,8-cineole, geranial, myrcene, linalool, neral, sabinene) y Sesquiterpenos (B.caryophyllene, B-elemen,  $\gamma$ -cadinene,  $\alpha$ -muurolene) (Okhale, 2016).

Meneses (2009) evaluó la variación del efecto inhibitorio del aceite esencial de *Lippia alba* obtenida de toda la planta y hoja-flor contra virus Fiebre Amarilla (YFV) y virus Dengue – 2 (DENV – 2). La planta entera de *Lippia alba* tuvo mayor efecto inhibitorio sobre el DENV – 2 en un ensayo *in vitro* utilizando células VERO (Meneses, 2009). Se debe tener una atención especial debido a la caracterización de estos extractos ensayados debido a su variabilidad química (Hennebelle, 2008). Para obtener aceites esenciales el proceso más empleado es la: destilación con agua o hidrodestilación; gracias al mínimo impacto generado, contribución a cerrar el ciclo de producción – consumo de materiales renovables y por el uso de agua como insumo del proceso. Una forma de evaluar la composición de los aceites esenciales es haciendo uso de la cromatografía de gases (Torres, 2011).

Las pruebas diagnósticas para ZIKV incluyen análisis por RT – PCR, aislamiento viral y ELISA; pero a veces es de difícil diagnóstico en los laboratorios debido a la baja viremia y por reacción cruzada de los anticuerpos con otros flavivirus (MINSA, 2016). El Test de Neutralización de Reducción de Placas (PRNT) usando virus viables es, actualmente, la prueba “Gold Standard” para la detección de anticuerpos neutralizantes; obteniendo, resultados óptimos en sus aplicaciones para serodiagnóstico diferencial de flavivirus. Este ensayo biológico está basado en la interacción específica entre el virus y el anticuerpo; sus resultados muestran la inhibición de infectividad viral fundamentado en la reducción de adhesión viral hacia las células, debido a la especificidad de los anticuerpos hacia las partículas virales (Maeda, 2013). Las pruebas de PRNT son usados para ayudar a verificar los resultados de ELISA. El principio de la inhibición de placas puede ser utilizado para evaluar la actividad antiviral de extractos vegetales conociéndose esta técnica como el ensayo de inhibición de placas (Rodríguez-Ortega, 2013 & Petersen, 2016).



Para los estudios de citotoxicidad se debe determinar la dosis no tóxica máxima (MNTD) en un ensayo de inhibición de virus (Kadir, 2013). Betancur – Galvis (2002), realizó un ensayo *in vitro* para la evaluación de la actividad antiviral del género de *Euphorbia* que son comúnmente usados en Colombia para el tratamiento de varias enfermedades tumorales y virales. Por otro lado, Chiow (2016) evaluó la citotoxicidad y actividad antiviral de los componentes activos de *Houttuynia cordata*; y obtuvo que el componente cinanserín hidrócloride es un buen inhibidor para el virus de hígado de ratón (MHV) y ciertos flavonoides mostraron una actividad antiviral comparativamente débil como es el quercetin que al interaccionar con el quercetrin potenció la actividad antiviral de DENV – 2 y redujo la citotoxicidad; sin embargo, la eficacia sinérgica de la combinación de flavonoides fue aún menor que la fracción acetato etílico. Finalmente, García *et al* (2003) realizó un ensayo de citotoxicidad usando el virus Junín (JUNV), virus de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y virus dengue tipo 2 (DEN-2) en plantas aromáticas nativas de la Provincia de San Luis en Argentina; obteniendo que las plantas *Lippia junelliana* y *Lippia turbinata*; *Artemisia gratissima*, *Artemisia douglasiana*, *Eupatorium patens* y *Tessaria absinthioides*; y, *Artemisia.douglasiana* y *Eupatorium. patens* tienen buena actividad inhibidora contra JUNV, HSV-1 y DEN-2, respectivamente.

Las células C6/36 (Células glándulas salivales de mosquito *Aedes albopictus*) fueron usados para generación de stocks de ZIKV y las células Vero son usadas para ensayo de citotoxicidad (Uraki, 2017). Dowall (2016) propagó el ZIKV usando la línea celular C6/36 para infectar en ratones C57BL/6 (Cugola, 2016). Lazear (2016) propagó ZIKV en C6/36 y VERO; y luego, tituló este virus para el ensayo de formación de placas en células VERO; en otros estudios, utilizaron células VERO para la propagación y titulación del ZIKV.

Las alteraciones inmunitarias y hormonales que tienen lugar durante el embarazo hacen que las infecciones sean más graves. La infección intrauterina puede provocar la muerte del feto, aborto espontáneo y parto de feto muerto. Además, puede interferir en el desarrollo del feto, provocar lesiones u originar malformaciones congénitas en el cerebro (microcefalia, etc.) entre otras (Lugones Botell, 2016). Hasta el momento no se ha podido demostrar el mecanismo patológico viral que ocasiona las malformaciones relacionadas en ZIKV (Méndez, 2017). Actualmente, se están probando vacunas y proponiendo nuevos fármacos mediante pruebas *in silico* con la finalidad de encontrar algún mecanismo que inhiba por completo la actividad de ZIKV.

## II. MARCO TEÓRICO.

### a. PLANTAS ANTIVIRALES

#### 1. Importancia

La naturaleza es un aliado silencioso debido a que provee de agentes antivirales a las plantas (Kulkarmi, 2014). Actualmente, las plantas con propiedades antivirales están logrando un gran interés en el campo de la medicina debido a su uso en el tratamiento de diferentes enfermedades virales (Ashraf, 2018). Hasta la fecha trabajos como el de Byler (2016) realizan screening *in silico* de compuestos antivirales de plantas para obtener mediante docking molecular la inhibición de ZIKV.

#### 2. Plantas con propiedades antivirales probados en otros virus

Las plantas antivirales en los últimos años con la ayuda de los datos etnobotánicos, la bioinformática y el cultivo celular; se están realizando diversos estudios en búsqueda de compuestos químicos que inhiban la actividad de distintos agentes infecciosos, por ejemplo: Byler (2016) realizó un screening de diversos compuestos químicos de plantas contra ZIKV y se determinó que los ligando polifenólicos a comparación de los terpenoides son buenos inhibidores del ZIKV. En el 2004, Vijayan haciendo uso de datos etnobotánicos determinó *in vitro* que el extracto metanólico de las partes aéreas de *Hypericum mysorensense* e *Hypericum hookerianum* demostraron actividad antiviral contra virus Herpes simplex (HSV) a una concentración de 100 y 50 µg/ml. Finalmente, en la región del Himalaya se realizó una revisión de varios trabajos relacionados con la actividad antiviral de plantas medicinales contra enfermedades virales que causan bronquitis determinando que de las 55 plantas etnomedicinales solo seis plantas fueron analizadas contra patógenos virales que causan bronquitis (Amber, 2016).

**b. *Lippia alba***

**1. Ubicación taxonómica**

Ver Anexo (Figura 3)

**2. Sinónimos**

*Camara alba* (Mill.)Kuntze; *Zappania odorata* Pers, *Lantana alba* Mill.,  
*Lippia alba* var *globiflora* (L'Hér) Moldenke, entre otros.

**3. Distribución**

Se encuentra en India (Gurdip, 2000), Sudáfrica (Day and Mc Andrew, 2003), desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Zoghbi, 1998; Aymard, 2005; Hennebelle, 2008 & Furtado, 2012) y Australia (Munir, 1993).

**4. Descripción**

Es un arbusto aromático de 1.5 m. de altura, se caracteriza por poseer hojas opuestas o a veces en forma de verticilos de tres, peciolada, lámina aovada y a menudo cuneados o atenuados en la base (Munir, 1993). En la inflorescencia posee una corola rosada, fauce amarilla, bordes irregulares, con simples tricomas blanquesinos simples en ambas caras. 2 cáliz lobados, estigma escápito, brácteas cordadas, verdes, además del fuerte olor adórfica de la planta (Furtado, 2012).

**5. Importancia etnobotánica**

*Lippia alba* es muy utilizada en la medicina popular debido a que es considerada en la gastronomía; contra males intestinales y gástricos (Zoghbi, 1998); se usa contra problemas respiratorios; cardiovasculares (Hipertensión), anemia, dolores, dolores de cabeza, enfermedades de la piel, heridas y contra la ansiedad (Hennebelle, 2008). Además según los datos recopilados en la región de colecta se le atribuyen que es bueno contra la fiebre, dolor de cabeza, males estomacales y menstruación.

## **c. ACEITE ESENCIAL**

### **1. Definición**

Son productos químicos que forman las esencias odoríferas que provienen de un gran número de vegetales (Torres, 2011).

### **2. Principales usos de los aceites esenciales**

Los principales usos están orientados a la perfumería; cosmética; industria farmacéutica, como aditivos e insumos para sintetizar compuestos; la alimentaria como aditivos y como insumos para la fabricación de productos de higiene personal y de limpieza doméstica (Cerpa, 2007) Además son usados en la pintura y en la industria de licores (Torres, 2011).

### **3. Técnica de hidrodestilación**

La destilación puede ser considerada como la separación de componentes de una mezcla de 2 o más líquidos en virtud de la diferencia de la presión de vapor (Stephen, 1940). En el área de la obtención de aceites esenciales se logran distinguir tres tipos de destilación. Estos son: Hidrodestilación, destilación con agua y vapor; y destilación al vapor directa (Guenther, 2013). Cuando se usa vapor de agua y la muestra vegetal se encuentra en contacto con el agua se llama hidrodestilación (Günther, 1948) El principio de hidrodestilación o destilación con agua es llevar a un estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados se puedan condensar y coleccionar (Albarracín, 2003) Con el fin de que estos vapores penetren los pequeños tejidos de la planta y se disuelva una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras. Disolviéndose a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie (Torres, 2011).

#### **d. VIRUS DEL ZIKA**

##### **1. Definición**

ZIKV es un flavivirus que tiene como principal vector transmisor al mosquito *Aedes aegypti* (Kostyuchenko, 2016).

##### **2. Historia**

El ZIKV fue aislado del suero de Mono Rhesus centinela en 1947 en el bosque Zika, Uganda (Dick, 1952); el segundo aislamiento confirmatorio fue recuperado de una muestra de pool de mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) en 1948 (Haddow, 1964). En Tanzania y Uganda se demostró por serología la infección en seres humanos por ZIKV (Dick et al., 1952). En 1968 se logró aislar el virus a partir de muestras humanas en Nigeria (Moore, 1975) En 1978, se reportaron casos de pacientes en Indonesia que tenían fiebre aguda y se demostró por estudios serológicos la evidencia por infección por flavivirus (Olson, 1981). En el 2007, se reportó en la Isla del Pacífico de Yap un gran brote de ZIKV esto debido a su baja inmunidad en la población de la isla (OMS/OPS, 2015). En el 2012, se determinó los genotipos asiático y africano del ZIKV (Haddow, 2012). En Octubre del 2013, el linaje asiático de ZIKV reapareció en la Isla Polinesia causando un largo brote en New Caledonia, Cook Island y Easter Island (Roth, 2014) En el 2014, con el brote de ZIKV en la Polinesia francesa se reportó una posible transmisión vertical de ZIKV de madre – hijo (Besnard, 2014). En América, se reportó la primera transmisión autóctona en la Isla de Pascua en el 2014 (OMS/OPS, 2015) En el 2015, en Brasil se dio la Alerta Epidemiológica en 18 estados (Song, 2017) A inicios del 2016, se emitió una alerta de transmisión autóctona de ZIKV en los países de Centro América y el Caribe (OMS/OPS, 2017).

Seguido de ello, en el resto de América incluyendo el Perú se reportaron los primeros casos autóctonos de ZIKV. (Song, 2017).

### **3. Clasificación**

Según Baltimore (1971), pertenece al grupo IV porque es un virus con ARN monocatenario positivo ((+) ssRNA)

### **4. Estructura**

Es de forma esférica. Posee un genoma de ARN monocatenario, no segmentado con sentido positivo. Envuelto en un cápside simétrico icosaédrico. Además tiene la proteína M y la glicoproteína E localizadas en la envoltura (Kuno, 2007). La estructura del ZIKV es similar a otros flavivirus; excepto, por los 10 aminoácidos que rodea el sitio de glicosilación Asn 154. El resto de carbohidratos asociados con este residuo funcionan como sitio de unión del virus al huésped deduciéndose que las diferencias en esta región puede influir en la transmisión del virus y la enfermedad (Sirohi, 2016)

### **5. Genotipo del Virus Zika (ZIKV)**

Actualmente, la cepa de ZIKV se clasifica en dos genotipos (Haddow, 2012 & Vazeille, 2018):

#### **5.1. Asiático**

El análisis filogenético de las secuencias de ZIKV reveló la existencia de 2 principales linajes y que la cepa responsable de epidemia en Yap y los casos en Camboya muy probablemente se originaron en el sudeste asiático. La examinación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas alineadas revelaron la pérdida de sitios potenciales de glicosilación en algunas cepas virales, lo cual está correlacionado con los constantes pasajes del virus (Haddow, 2012) El análisis

genético reveló que el genotipo asiático es el responsable del último brote de virus Zika (ZIKV) en las islas del pacífico y las américas (Lanciotti et al., 2016) Además, determinó que la proteína NS1 en el genotipo asiático facilita la adquisición de flavivirus por parte de hospedadores mamíferos infectados y, posteriormente, aumenta la prevalencia viral en mosquito (Liu, 2017).

## **5.2. Africano**

Se determinó en un trabajo realizado en *Aedes aegypti* que el genotipo africano es más fácil de ser transmitido que el genotipo asiático (Vazeille, 2018)

## **6. Ciclo de replicación viral**

Las partículas de ZIKV en la célula siguen la vía lítica. La endocitosis se inicia cuando el virión de ZIKV se une a los receptores de la membrana hospedera a través de la glicoproteína E. Luego de la acidificación del endosoma, la envoltura y la nucleocápside se desintegra; liberando el genoma de ZIKV en el citoplasma. El genoma es transportado a los ribosomas, donde se traduce. El genoma de ZIKV se replica a través de la transcripción en el citoplasma en una reacción catalizada por la ARN polimerasa viral. Luego se crean paquetes vesiculares, en las cuales el ARN de polaridad negativa se transcribe al ARN viral de polaridad positiva por acción de la ARN polimerasa viral. Estas vesículas reclutan las proteínas del virión y el genoma viral al aparato de Golgi en donde son ensamblados. Luego, son liberados por exocitosis, previa maduración del virión. En resumen, el ciclo infeccioso comprende: la unión y entrada de la partícula viral; la producción de ARNm viral y su traducción por los ribosomas del huésped; la replicación del genoma y el ensamblaje; y la liberación de las partículas virales que contienen el



genoma. Las nuevas partículas de virus producidas durante el ciclo infeccioso pueden infectar otras células (Gillespie, 2010 & Flint, 2015).

## **7. Epidemiología**

El ZIKV es una enfermedad tropical que está muy descuidada aunque la amenaza de ZIKV puede ser mitigada por los programas de control del virus Dengue y Chikungunya (Wong, 2013) El reciente brote de ZIKV infectó a 1 millón de personas en 30 países (Zhao, 2017) Esto se debe a que el ZIKV tiene un alto potencial de expansión geográfica dentro de los países con la ayuda de *Aedes* spp., siendo el su principal vector *Aedes aegypti* (Chouin-Carneiro, 2016), y una buena estabilidad a nivel estructural del virus (Kostyuchenko, 2016). Sin embargo, recientes estudios revelan que el vector al transmitir virus Dengue, Chikungunya y Zika genera una competencia viral siendo los más predominantes virus Dengue y Chikungunya (Vazeille, 2018). Según el último Boletín Epidemiológico del Perú (SE 36 – 2018) que en el 2016 el departamento de Loreto tuvo la mayor cantidad de casos reportados (1494) para ZIKV; en el 2017, los departamentos más afectados fueron Ica y Loreto con 4317 y 1205 casos reportados respectivamente; y en el 2018, Amazonas y Piura tienen 352 y 255 casos reportados hasta la fecha, respectivamente (MINSA, 2018). Además, durante los últimos 3 años solo en el 2017 hubo una alta cantidad de casos reportados para ZIKV esto debido al fenómeno del Niño Costero (MINSA, 2018) El mayor número casos reportados se observó en la población adulta entre los 30 a 59 años con el 38.75% de casos reportados; además, el grupo más afectado son las mujeres con 61.65 % de casos reportado. Por último durante el 2018, la tasa de incidencia acumulada más alta se encuentra en la población joven (18 a 29 años) con un 4.15 de TIA por 100 000

hab.; seguido de los adolescentes (12 a 17 años) con 3.44 y los adultos (30 a 59 años) con 3.33 (MINSA. 2018).

## **8. Vectores y los tipos de transmisión del virus Zika**

En África, se encuentra la mayor cantidad de vectores transmisores de ZIKV: *Aedes africanus*, *Aedes apicocoargenteus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer*, *Aedes vitattus* y *Aedes aegypti*. En Asia, *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) se reportó como un potencial vector de ZIKV (Wong, 2013) En el brote en la Isla de Yap el *Aedes hensilli* fue el mosquito más predominante (Duffy, 2009)

## **9. Impacto social y prevención**

Dada la ausencia de agentes antivirales o vacunas para curar o prevenir estas enfermedades, la única opción disponible de prevención es el control del mosquito *Aedes* spp. fortaleciendo los programas para reducir la densidad y transmisión de enfermedades de los vectores; incrementar la capacidad de diagnóstico e incentivar la educación comunitaria (Álvarez Escobar, 2018) El incremento de la diseminación del ZIKV se debe a una urbanización no planificada, un crecimiento acelerado y un sistema de salud deficiente, que facilita el normal desarrollo del mosquito (Kraemer, 2015); por ello, el impacto en la sociedad de ZIKV a nivel mundial fue muy alto en nuestra región.

## **10. Vacunas**

La vacuna para ZIKV se encuentra en ensayo clínico fase 3, esta vacuna buscar activar la respuesta B y T conjuntamente para la inhibición del virus (Eiros, 2018 & Roth, 2018).

## **e. CULTIVO CELULAR**

### **1. Definición**

Es un sistema *in vitro* que mediante el uso de líneas celulares emplea distintas técnicas de detección; empleado en la agricultura, bacteriología (Sharma, 2018), biotecnología (Hoeksema, 2018), cosmetología (SCC, 2000), farmacia (Gilbert, 2018), inmunología (Siburian, 2018) y virología (Jiang, 2018).

### **2. Tipos de cultivo celulares**

#### **2.1. Cultivo primario**

Las células presentan el mismo cariotipo del tejido original, manteniendo su viabilidad durante un tiempo limitado y es difícil que se reproduzcan en cultivo (Reina, 2003 & Vargas, 2016).

#### **2.2. Línea celular**

Son cultivos celulares que se establecen a partir de un tejido y se mantienen en cultivo ilimitadamente. Se dice que son inmortales por que pierden la senescencia (Reina, 2003 & Vargas, 2016)

Dentro de cada línea celular pueden establecerse clones celulares, que son poblaciones derivadas de una sola célula de esa línea celular. En los últimos años, el uso de líneas celulares ha beneficiado el diagnóstico *in vitro* de varias áreas de la ciencia como en la industria, en la agricultura, en la medicina, entre otros; existen líneas celulares como:

- Línea celular BHK – 21: Obtenido de riñón de Hámster dorado *Mesocricetus auratus*.
- Línea celular C6/36: es un clon obtenido de glándulas salivales del mosquito *Aedes albopictus*.

- Línea celular VERO – 76: Obtenido de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*.

### 3. Tipo de crecimiento celular

Las células se desarrollan creciendo en suspensión o sobre una superficie formando monocapa celular. Estas células se adhieren a una superficie sólida formando una capa celular que puede ser observada en el microscopio invertido (Reina, 2003 & Vargas, 2016).

### 4. Condiciones importantes para el cultivo de células

Para el manejo de líneas celulares se deben considerar 4 puntos importantes (Reina, 2003 & Freshney, 2006):

- $\text{CO}_2$ : es una molécula que es producido en el ciclo de Krebs al oxidar glúcidos, aminoácidos y ácido grasos
- Actividad del agua: Se utiliza para evitar la desecación del medio de cultivo, ayuda a una mejor propagación del  $\text{CO}_2$  y a mantener una temperatura homogénea en el interior de las incubadoras.
- Temperatura: tiene gran influencia en la mitosis celular. Además la temperatura depende mucho del tipo de línea celular.
- pH: El crecimiento celular en la mayoría de cultivos celulares oscila entre los 6.9 y 7.4

Además, se deben considerar algunos detalles extras como (Reina, 2003; Freshney, 2005 & Vargas, 2016):

#### a. Materiales empleados

Para que las células prendan en los frascos y placas celulares necesita de materiales específicos como plásticos de poliestireno, policarbonato, polipropileno, etc.; además deben ser estériles y descartables para evitar contaminación. Por otro lado, el material de

vidrio debe ser de calidad que debe estar compuesto de carbonato de sodio y borosilicato, los cuales, serán esterilizados por calor seco.

**b. Medio de cultivo celular**

1. Medio de crecimiento: Contiene azúcares, sales, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, con antibiótico y antimicótico y Suplementado con 10% de suero bovino fetal.
2. Medio de mantenimiento: Contiene los mismos componentes que el medio de crecimiento y Suplementado con 2% de suero bovino fetal.
3. *In vitro*, la célula para sobrevivir debe tener los siguientes nutrientes:
  - Agua: Se debe emplear agua destilada estéril.
  - Aminoácidos: Son importantes para la formación de proteínas.
  - Antibióticos: se usa penicilina y estreptomicina para evitar la contaminación contra bacterias.
  - Antimicótico: se usa anfotericina B para evitar la contaminación contra hongos.
  - Carbohidratos: Proveen la energía necesaria para el desarrollo de las células.
  - Iones inorgánicos: son necesarios para mantener la presión osmótica y pH, como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{CO}_3^{-2}$ .
  - Suero bovino fetal: Se emplean como fuente de factores de crecimiento y hormonas para la diferenciación celular.
  - Vitaminas: Son esenciales en pequeñas cantidades.

## **5. Agentes de dispersión celular**

La separación de la monocapa celular puede realizarse por agentes mecánicos (scraper) y enzimático (Trypsina) (Vunjak-Novakovic & Freshney, 2006).

## **6. Conservación de células.**

Se utilizan sustancias químicas como el dimetilsulfóxido (DMSO) que, por cadena de frío, impiden la formación de cristales de hielo que rompen las estructuras celulares. La idea es criopreservar las células en los momentos que ya no se trabaje con ellas; con la finalidad, de ahorrar material de cultivo celular (Vunjak-Novakovic & Freshney, 2006) .

## **7. PRNT**

Es la técnica “Gold Standard” para el serodiagnóstico diferencial de flavivirus y otros virus (Maeda, 2013) Este ensayo se basa en la interacción específica entre el virus y el anticuerpo; pero al tratarse de extractos de planta el enfrentamiento se da entre el extracto antiviral a distintas concentraciones y el virus con el fin de determinar el punto de inhibición de la replicación de los virus mediante el ensayo de inhibición de las placas o calvas (Rodríguez – Ortega, 2013).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### a. PROBLEMA

ZIKV es un virus perteneciente a la familia flaviviridae, quien tiene como principal vector transmisor al mosquito del género *Aedes*; el cual también es vector del Virus Dengue, Virus Fiebre Amarilla, y Virus Chikungunya. En los dos últimos años, el ZIKV causó una serie de problemas a nivel social y económico en América Latina; por ello, es considerado un virus agresivo que ataca con mayor severidad a la población de recién nacidos cuyas madres gestantes fueron infectadas en las primeras semanas de embarazo. Además se le asocia con la microcefalia, síndrome Guillain Barré u otros síndrome neurológicos. En el Perú, *Aedes aegypti* se encuentra distribuido en 20 departamentos a nivel nacional (MINSA, 2016) esto aumenta el riesgo de introducción y proliferación del ZIKV en la población peruana. En la actualidad, se están probando vacunas contra ZIKV y es importante ver tratamientos alternativos que inhiban el mecanismo de acción de ZIKV.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN.**

ZIKV causa una enfermedad febril en humanos que no es fatal, pero las evidencias recientes han demostrado que las mujeres embarazadas son más sensibles a la infección ZIKV durante el primer trimestre de gestación causando daños en el feto como microcefalia y retardo mental en el recién nacido. Así como también, posibles casos de infertilidad que se han demostrado en ratones adultos machos, mas no se ha reportado en la especie humana. En la actualidad, se están probando vacunas contra el ZIKV; por este motivo, es importante la búsqueda de una medicina alternativa que inhiba por completo la acción de este virus en nuestro organismo; ya que beneficiaría a la población infectada de recién nacidos que nacen con microcefalia, retardo mental o alguna enfermedad congénita. Siendo una solución para el Estado Peruano la reducción del gasto en las terapias y rehabilitaciones de los niños enfermos. Finalmente, el propósito del trabajo es evaluar la actividad antiviral del aceite esencial de *Lippia alba* contra el ZIKV.



## **V. OBJETIVO.**

### **a. OBJETIVO PRINCIPAL**

- Determinar la actividad antiviral de *Lippia alba* contra el Virus Zika en la línea celular VERO – 76.

### **b. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Evaluar las líneas celulares VERO – 76 y C6/36 para la propagación del ZIKV
- Evaluar la titulación de ZIKV con el método semisólido y sólido.
- Establecer la concentración de la citotoxicidad del aceite esencial en las dos líneas celulares VERO – 76 y C6/36.
- Determinar el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Lippia alba* contra ZIKV.

## **VI. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

- Los aceites esenciales de *Lippia alba* presentan actividad antiviral contra ZIKV en células VERO – 76 y C6/36.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **a. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Aceite esencial de *Lippia alba*, línea celular C6/36, línea celular VERO – 76 y ZIKV.

### **b. MATERIAL DE LABORATORIO.**

#### **1. Reactivos.**

10% Suero bovino fetal, Ácido acético glacial FISHER SCIENTIFIC, 500ml/Glass, Agua bidestilada, Alcohol 96° 1L, Alcohol puro, Aminoácidos no esenciales (100x)100ml/Glass GIBCO, Antibiótico-antimicótico (100x)100ml/Glass GIBCO, Dimetilsufoxido 500 ml, E-MEM GIBCO, Eosina, Hepes 1M, Hipoclorito de sodio 5%, L-Glutamina 200Mm (100x)100ml/Glass GIBCO, Medio mínimo esencial más sales de Earle, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 gr, NaCl 25gr, Naphtol Blue Black 25g SIGMA, Sodio piruvato (100mM), Sulfato de sodio anhidro y Tripsina.

#### **2. Material.**

##### **2.1. Extracción de aceites esenciales**

Aparato tipo Clevenger, Manta de calor, Frascos oscuros y Manguera de látex

##### **2.2. Prueba *in vitro*.**

Algodón 1000g, Cámara de Neubauer, Cinta masking tape, Criobox, Crioviales 2 ml, Frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, Frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, Gasa aséptica, Guantes de nitrilo, Microplacas de 96 pozos con fondo en U, Parafilm, Pipetas desechables, Placas de 24 pozos con fondo plano (Estéril), Reservorios estériles, Tips estériles con filtro de 1000

ul., Tips estériles con filtro de 20 – 200 ul., Tubo de centrífuga de 15 ml y Tubo de centrífuga de 50 ml

### **3. Equipo.**

Autoclave, Balanza analítica, Baño María, Cabina de Bioseguridad Clase 2 Tipo A-II, Centrífuga, Incubadora, Microscopio invertido, Mini – centrífuga o Spinner y Vórtex.

## **c. MÉTODOS.**

### **1. Colecta de *Lippia alba*.**

#### **1.1. Lugar de Colecta.**

La planta se colectó en la comunidad de Miraflores, Bagua Grande, Amazonas y fue ubicado a 5°52.534' S, 78° 23.087' W a una altura de 1,699 m.s.n.m (Fig. 1). Se utilizó la aplicación GPS Status & Toolbox de Android para ubicar con exactitud el punto de colecta (Fig.2).

#### **1.2. Colecta y traslado de *Lippia alba* de Planta.**

Se usó las metodologías empleadas por Mott (1979), Cerpa (2007) y Torres (2011). Las plantas fueron cuidadosamente colectadas usando una gasa y tijera de podar. Luego se procedió al secado extendiéndola encima de una malla de polietileno y debajo de una malla de polisombra. Finalmente, se transportó a la ciudad de Lima las plantas en bolsas de polipropileno.

#### **1.3. Identificación de Planta.**

La división de Botánica – Herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM donde se determinó la especie *Lippia alba* (Mill.) N.3.Br. Ex Britton & Wilson (Fig.3) y se donó una muestra al museo con fines académico con el voucher N° 300373 (Fig.4).

### **2. Extracción de aceites esenciales de *Lippia alba*.**

#### **2.1. Instalación del sistema de extracción**

El sistema de hidroddestilación por arrastre de vapor consistió en una manta de calor de 5 Litros, un aparato tipo cleverger y un sistema de enfriamiento (Fig. 5)

## **2.2. Traslado e ingreso del material vegetal**

La muestra vegetal se refrigeró a 4°C hasta su uso. Al momento de ingresar el material vegetal al balón esmerilado, según autores como Torres (2011), sugieren que la muestra vegetal sea picada lo más pequeña posible. Cabe mencionar que la manipulación de la muestra vegetal fue con guantes estériles.

## **2.3. Extracción del aceite esencial**

La muestra vegetal en trozos pequeños de *Lippia alba* una vez ingresado al balón esmerilado (Fig.6) se llenó con agua bidestilada y se encendió el equipo de hidrodestilación. Una vez que inició el proceso de evaporación (Fig.7) se suministró éter de petróleo para que recupere las gotas del aceite esencial extraídos (Chen, 2018). El proceso de hidrodestilación duró 3 horas (Duschatzky, 2005) como sugieren los protocolos estándar de Europa y EE.UU.

## **2.4. Separación del aceite esencial**

Al culminarse las 3 horas por hidrodestilación se realizó la separación del aceite con el agua usando sulfato de sodio anhidro para deshidratar la mezcla (Verma, 2009 & Verma, 2012) y fue almacenado en frascos acaramelados de 5 ml (Fig.8). Finalmente, se dejó evaporar el éter de petróleo.

## **2.5. Almacenamiento**

El aceite esencial se almacenó a -20 °C (Fig.9).

### **3. Obtención, estandarización y producción de semilla viral de Zika en VERO – 76 y C6/36.**

#### **3.1. Obtención del suero e Identificación.**

Se trabajó con un aislamiento de ZIKV donado por el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo y se hizo el análisis por RT – PCR (Tiempo Real)

#### **3.2. Propagación de células para formar monocapa completa**

##### **3.2.1. En Línea celular Vero – 76**

Se usó el protocolo del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (2013) el cual fue estandarizado en el laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la UNMSM. Para la formación de monocapa confluyente se trabajó con una concentración de  $1.25 \times 10^5$  cel/ml mezclado con medio de crecimiento (MC) con un pH estable de 6.9; luego, se incubó a 37°C hasta la formación de monocapa confluyente al 100%. El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripán.

##### **3.2.2. En línea celular C6/36**

Se usó el protocolo del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (2013) el cual fue estandarizado en el laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la UNMSM. Para la formación de monocapa confluyente se trabajó con una concentración de  $2.5 \times 10^5$  cel/ml mezclado con medio de crecimiento (MC) con un pH estable de 6.9; luego, se incubó a 28°C hasta la formación de monocapa confluyente al 100%. El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripán.

### **3.3. Propagación y titulación de ZIKV**

#### **3.3.1. Control de la infección viral**

Según el manual “Biosafety in microbiological and biomedical laboratories” (2009) se recomienda trabajar el ZIKV en un nivel de Bioseguridad 2 con una cabina clase 2 tipo II – A. Además se trabajó con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud. (2006).

#### **3.3.2. En Línea celular Vero – 76.**

Se trabajó con una monocapa confluyente al 100%, se descartó el sobrenadante. Luego se diluyó el virus en 1:10 usando como diluyente el medio de mantenimiento (MM) con un pH estable de 6.9 y se inoculó 100 ul de virus en la monocapa confluyente. Luego se incubó el frasco infectado y el frasco control durante 1 hora a 37°C para el periodo de adherencia. Finalmente, se añadió 6 ml de MM a cada frasco e incubándose a 37°C hasta su tiempo de cosecha viral.

#### **3.3.3. En línea celular C6/36**

Se trabajó con una monocapa confluyente al 100%, se descartó el sobrenadante. Luego se diluyó el virus en 1:10 usando como diluyente el medio de mantenimiento (MM) con un pH estable de 6.9 y se inoculó 100 ul de virus en la monocapa confluyente. Luego se incubó el frasco infectado y el frasco control durante 1 hora a 28°C para el periodo de adherencia. Finalmente, se añadió 6 ml de MM a cada frasco e incubándose a 28°C hasta su tiempo de cosecha viral.

### **3.4. Cosecha de ZIKV**

Se cosechó el sobrenadante al observar tres cruces (3+) de efecto citopático (ECP); luego se centrifugó a 3000 rpm/10min/4°C y se alicuotó 500µl de sobrenadante en crioviales de 2 ml (semilla viral) Finalmente, se almacenó a -80°C.

### **3.5. Titulación viral**

Se utilizó una placa de fondo plano de 24 pozos con monocapa confluyente al 100%, se descartó el sobrenadante. Luego se diluyó el virus propagado en C6/36 y VERO – 76 en 1:10 usando como diluyente el medio de mantenimiento (MM) con un pH estable de 6.9 y se incubó durante 1 hora (hr) a 37°C. Luego, se inoculó 50 µl en cada pozo y se incubó durante 3 horas a 37°C. Finalmente, se añadió 500 µl de overlayer y se incubó a 37°C hasta el tiempo óptimo de plaqueo viral.

### **3.6. Coloración.**

Se coloreó las células con Naphthol Blue Black (NBB).

## **4. Citotoxicidad del extracto de aceite esencial de *Lippia alba* en la línea celular VERO y C6/36**

### **4.1. Plaqueo**

#### **4.1.1. En línea celular VERO – 76.**

Para la formación de monocapa confluyente se trabajó con una concentración de  $1.25 \times 10^5$  cel/ml mezclado con medio de crecimiento (MC) con un pH estable de 6.9; luego, se incubó a 37°C hasta la formación de monocapa confluyente al 100%. El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripán.



#### **4.1.2. En línea celular C6/36**

Para la formación de la monocapa confluyente en placas de fondo plano se trabajó con una concentración de  $2.5 \times 10^5$  cel/ml mezclado con medio de crecimiento (MC) con un pH estable de 6.9; luego, se incubó a 28°C hasta la formación de monocapa confluyente al 100%. El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripán.

#### **4.2. Prueba de citotoxicidad.**

##### **4.2.1. En línea celular VERO – 76.**

Se diluyó inicialmente el aceite esencial con una mezcla tween 80 – etanol (1:0.5) (Duschatzky, 2005). Luego se realizó varias diluciones utilizando como diluyente medio de mantenimiento (MM) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se inoculó a cada pozo el inóculo incubado y seguido de ello se incubó a 37°C durante 6 días.

##### **4.2.2. En línea celular C6/36**

Se diluyó inicialmente el aceite esencial con una mezcla tween 80 – etanol (1:0.5) (Duschatzky, 2005). Luego se realizó varias diluciones utilizando como diluyente medio de mantenimiento (MM) y se incubó durante 1 hora a 28°C. Finalmente, se inoculó a cada pozo el inóculo incubado y seguido de ello se incubó a 28°C durante 6 días.

#### **4.3. Coloración**

Se coloreó las células con Naphthol Blue Black (NBB).

## **5. Prueba de inhibición por reducción de placas para ZIKV**

Se diluyó inicialmente el aceite esencial con una mezcla tween 80 – etanol (1:0.5) (Duschatzky, 2005) y se trabajó con el  $CC_{50}$  obtenido de la prueba de citotoxicidad, eso quiere decir que se trabajó con una dilución 1/160 y 1/240. Por otro lado, se trabajó con la semilla viral propagado en C6/36 diluyéndolo en medio de mantenimiento (MM) hasta la dilución 1:10000, la cual fue mezclado con medio de mantenimiento para obtener la solución de trabajo viral (Working solution viral “WSV”). La mezcla extracto antiviral – WSV (1:1) fue incubado a 37°C durante 1 hora. Luego, se inoculó 50 µl/pozo y se incubó durante 3 horas. Finalmente se añadió el overlayer y se incubó durante 6 días.

## **6. Procesamiento estadístico.**

Se utilizará el paquete estadístico SPSS y el método estadístico utilizado será el Test de Rango con signos de Wilcoxon para variables no paramétricas usando tablas univariadas con un nivel de confianza del 95%.

## VIII. RESULTADOS.

### 1. Extracción de aceites esenciales de *Lippia alba*.

Se obtuvo de aproximadamente 300.32 gr de muestra vegetal 3.0757 gr de aceite esencial crudo de *Lippia alba* (Tabla.1).

Tabla.1: Extracción en crudo del aceite esencial de la muestra total de *Lippia alba*

Nº	Peso de la muestra (gr)	Peso del aceite esencial (gr)	Volumen (µl)
1	300.1	2.994	320
2	259.35	2.705	280
3	292.15	2.7391	280
4	350	4.0324	490
5	300	2.908	300

### 2. Estandarización y producción de semilla viral de Zika en VERO.

#### 2.1. Obtención del suero

Se trabajó con un aislamiento de ZIKV donado por el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo.

#### 2.2. Identificación y pureza del virus

Se comprobó su pureza usando la técnica de RT – PCR tiempo real siendo positivo para ZIKV (Fig.10). Por otro lado, las muestras que amplificaron para ZIKV determinaron una eficiencia  $R^2$  de 0.99862.

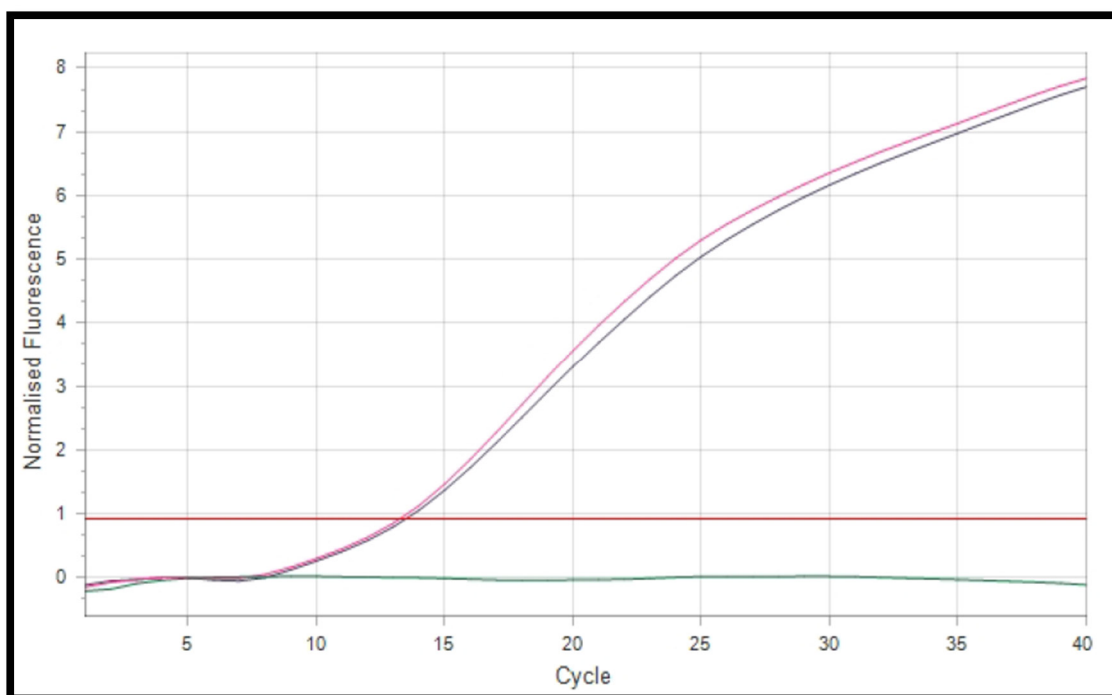


Fig.10: Identificación y amplificación de la extracción de ZIKV por medio de la técnica de RT – PCR (Tiempo Real).

## 2.3. Producción de ZIKV en línea celular VERO – 76

### 2.3.1. Cosecha viral

Se hizo el pasaje viral inicial de la muestra stock (Fig.11) y resultó que se evidenciaba efecto citopático en la línea celular VERO – 76 al 7<sup>mo</sup> día post – infección (Fig.12); luego se hicieron pasajes virales sucesivos hasta que el virus se adaptó a la línea celular VERO – 76; finalmente, a partir del pasaje viral N° 4, en adelante, se obtuvo que al quinto (5<sup>to</sup>) día post – infección se observó el efecto citopático (ECP) en tres cruces (3+) con una monocapa al 25% de prendimiento (Tabla 2).

Tabla 2: Adaptabilidad de ZIKV en la línea celular VERO – 76.

N° DE PASAJE	DÍA DE ECP	ECP ( 3 Cruces)
1	7	3+
2	6	3+
3	6	3+
4	5	3+
5	5	3+
6	5	3+

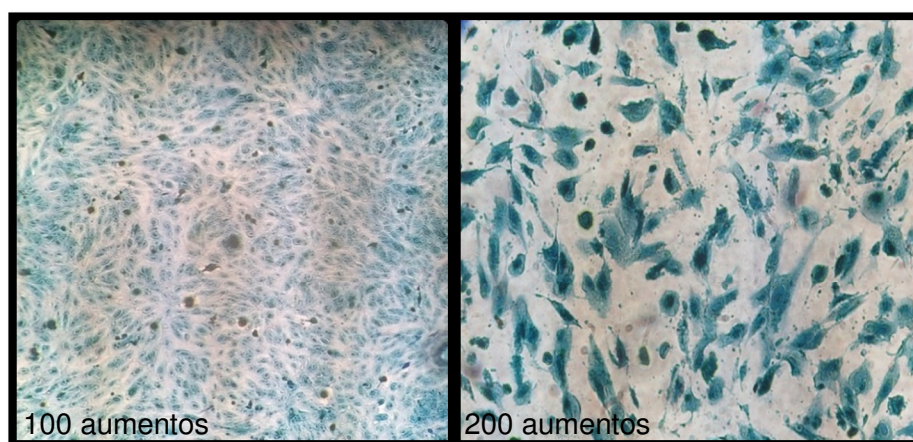


Fig.12: Se observa la línea celular VERO – 76: Control de células (Izquierda) y ECP 3+ (Derecha)

Por otro lado, se comprobó que la línea celular C6/36 (Fig.13) propagó con mayor rapidez ZIKV que la línea celular VERO – 76 (Fig.12). Ambas propagaciones se infectaron con semilla viral propagada previamente en VERO – 76. (Tabla 3)

Tabla 3: Tiempo de propagación de ZIKV en las líneas celulares VERO – 76 y C6/36.

Línea celular	VERO – 76	C6/36
Tiempo de propagación (ECP)	5	3

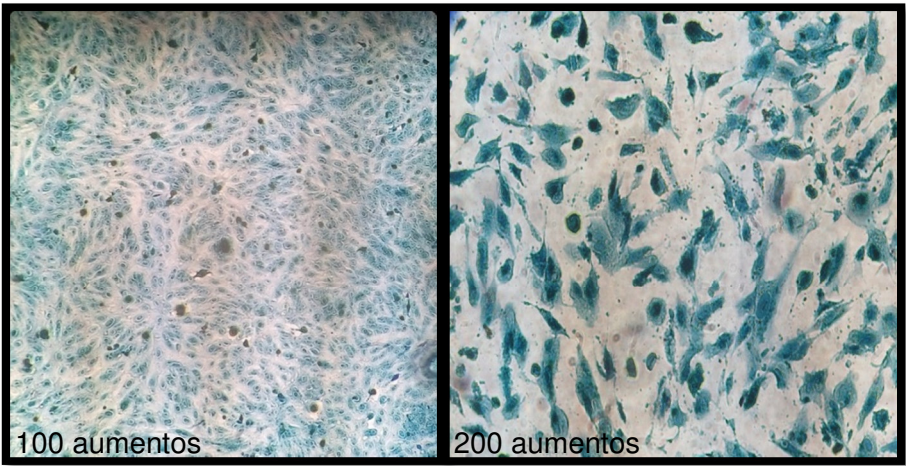


Fig.12: Se observa la línea celular VERO – 76: Control de células (Izquierda) y ECP 3+ (Derecha).

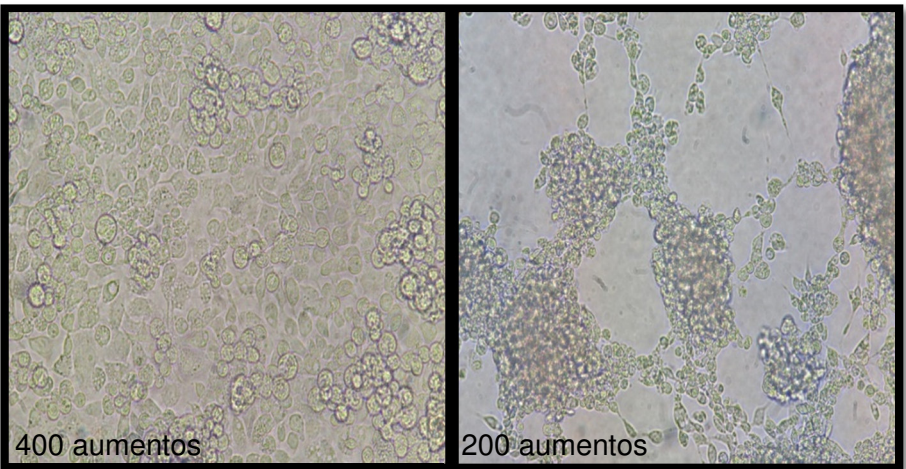


Fig.13: Se observa la línea celular C6/36 *Aedes albopictus*: Control de células (Izquierda) y ECP 3+ (Derecha).

## 2.4. Titulación de ZIKV en línea celular VERO -76

Se halló la titulación viral de ZIKV desde su pasaje inicial hasta el pasaje N° 6 (PV – 6), determinando que a partir del pasaje N°4 (PV – 4) se pueden observar placas definidas y grandes. Cabe recalcar, que el día óptimo de revelación con colorante NBB para ZIKV es el día 6 post infección (Tabla 4).

Tabla 4: Cinética de ZIKV en la línea celular VERO – 76.

N° DE PASAJE		UFP/ml
P – 1		$9 \times 10^2$
P – 2		$1.12 \times 10^3$
P – 3		$2.6 \times 10^4$
P – 4		$2 \times 10^5$

N° DE PASAJE	Concentración de partículas virales por cada método	
	MÉTODO	
PASAJE 4	Semi sólido	$3.2 \times 10^5$ UFP/ml
	Sólido	$3 \times 10^6$ UFP/ml

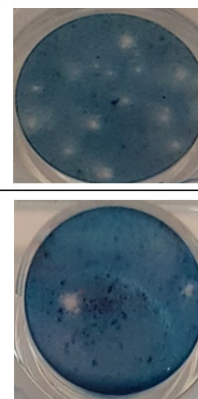


Fig. 14: Concentración de partículas virales utilizando una concentración de células de  $1.25 \times 10^5$  cel/ml.



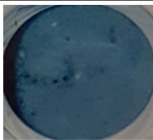
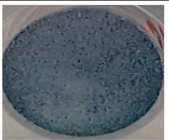
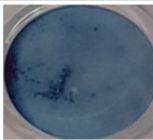

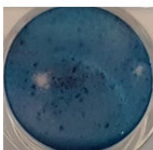
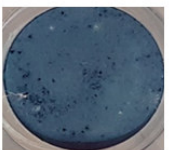
N° DE PASAJE	CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS EN MONOCAPA (cél/ml)			
	1.25 x 10 <sup>5</sup> (48 hrs)		2.5 x 10 <sup>5</sup> (24hrs)	
PASAJE 2	1.12 x 10 <sup>3</sup>		1.1 x 10 <sup>3</sup>	
PASAJE 3	2.6 x 10 <sup>4</sup>		1.2 x 10 <sup>4</sup>	
PASAJE 4	2 x 10 <sup>5</sup>		1 x 10 <sup>5</sup>	

Fig.15: Titulación viral a distintas concentraciones de células usando el método sólido

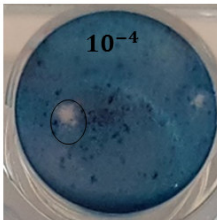
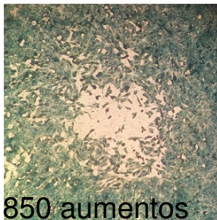
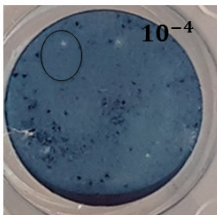
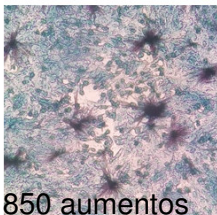
N° DE PASAJE	CONCENTRACIÓN CELULAR	OBSERVACIÓN	
PASAJE 4	1,25 x 10 <sup>5</sup> cél/ml		
	2,5 x 10 <sup>5</sup> cél/ml		

Fig. 16: Método sólido: Tamaño y forma de la placa.

Por otro lado, se comprobó que la línea celular C6/36 obtuvo un mayor título viral que la línea celular VERO – 76 (Fig.18). Cabe mencionar, que ambas propagaciones se hicieron desde la semilla viral inicial del pasaje 4 (P4) propagada previamente en VERO – 76. (Tabla 5)

Tabla 5: Titulación de ZIKV en la línea celular VERO - 76

Nº de Pasaje viral	VERO - 76	C6/36
P5	$2.6 \times 10^4$ UFP/ml	$9.8 \times 10^6$ UFP/ml

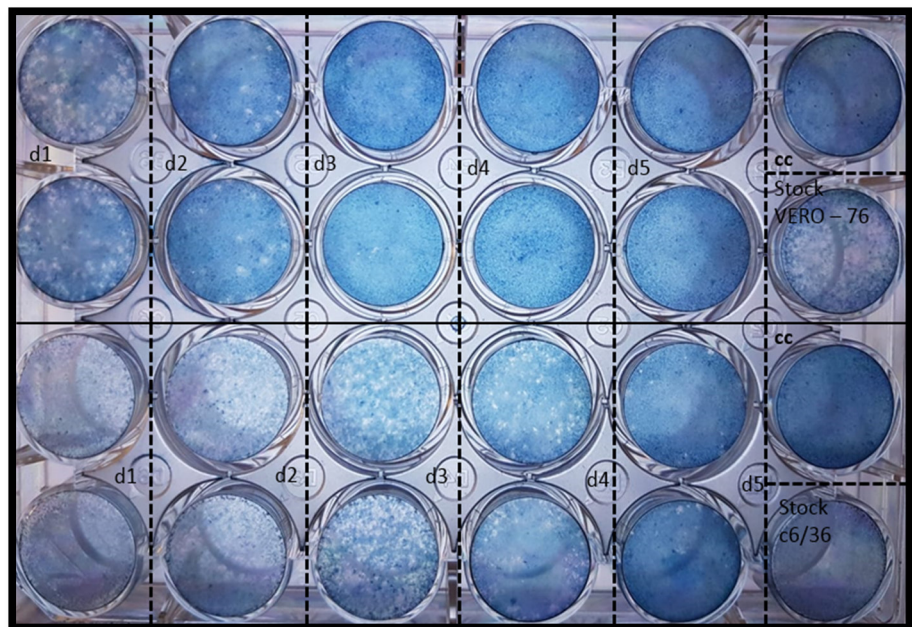


Fig. 18: Titulación de la semilla viral de ZIKV propagado previamente en las líneas celulares VERO – 76 (superior) y C6/36 (Inferior). Las diluciones ( $d_n$ ) seriadas fueron de 1:10, Control de células (CC) y semilla viral (Stock).

### 3. Citotoxicidad del aceite esencial de *Lippia alba* en la línea celular VERO – 76.

En la línea celular C6/36 la no citotoxicidad se obtuvo a una concentración de 400.8 µg/ml y para la línea celular VERO – 76 se obtuvo a una concentración de 167 µg/ml.. (Tabla 6)

Tabla 6: Evaluación de la citotoxicidad en base a la monocapa celular.

Nombre del pozo		Línea celular	
		C6/36	VERO – 76
d <sub>1</sub>	4.008 mg/ml	-	-
d <sub>2</sub>	1.336 mg/ml	-	-
d <sub>3</sub>	668 µg/ml	-	-
d <sub>4</sub>	400.8 µg/ml	+	-
d <sub>5</sub>	334 µg/ml	+	-
d <sub>6</sub>	250.5 µg/ml	+	-
d <sub>7</sub>	167 µg/ml	+	+
d <sub>8</sub>	83.5 µg/ml	+	+
d <sub>9</sub>	41.75 µg/ml	+	+
d <sub>10</sub>	20.88 µg/ml	+	+
d <sub>11</sub>	13.36 µg/ml	+	+
d <sub>12</sub>	10.44 µg/ml	+	+
d <sub>13</sub>	8.02 µg/ml	+	+
d <sub>14</sub>	5.22 µg/ml	+	+

Donde:

+ = monocapa completa  
 - = monocapa incompleta

Además, se obtuvo la gráfica del punto de corte no citotóxico del aceite esencial de *Lippia alba* en la línea celular C6/36 y VERO – 76 con una concentración de 400.8 µg/ml y 167 µg/ml, respectivamente. (Fig. 20)

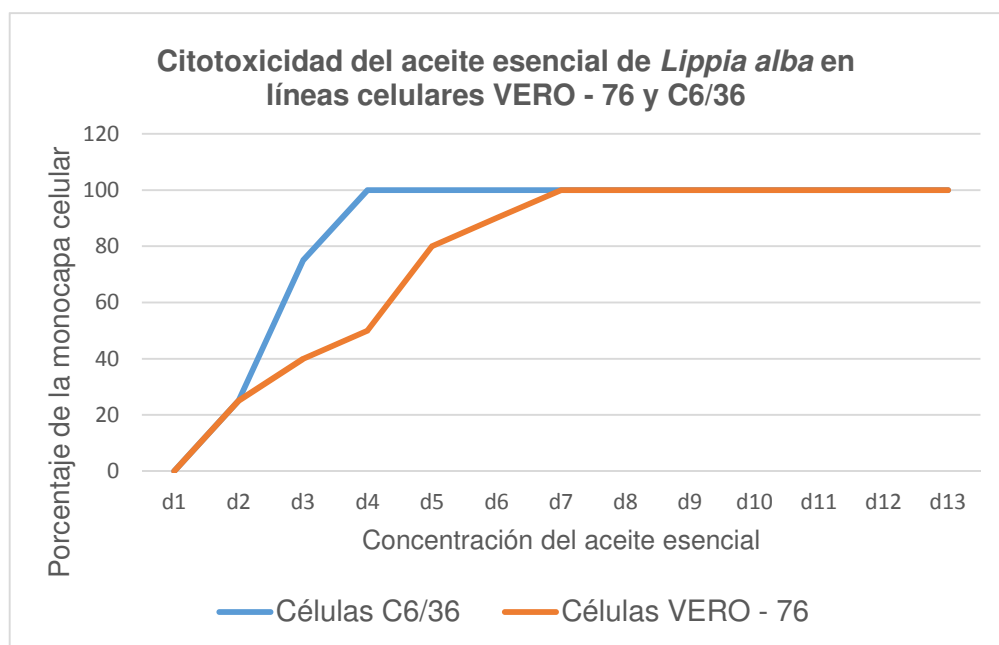


Fig. 20: Se observa el punto de corte al 100 % de monocapa de las líneas celulares C6/36 y VERO – 76. Ver (Tabla 6).

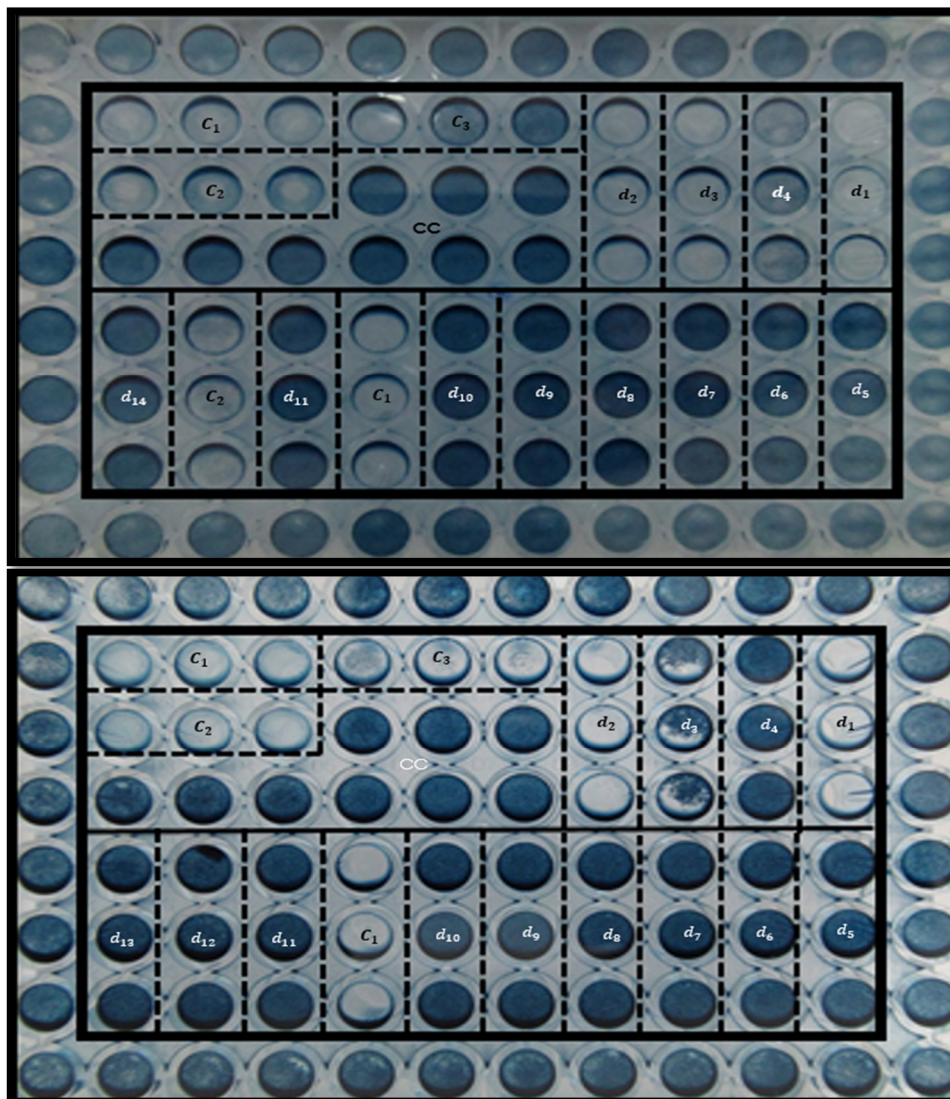


Fig. 21: Placa de citotoxicidad en VERO (Arriba) y C6/36 *Aedes albopictus* (Abajo)

CC: Control de células VERO Y C6/36.

C<sub>1</sub>: Control de Tween, etanol y aceite esencial.

C<sub>2</sub>: Control de Tween y etanol.

C<sub>3</sub>: Control de aceite esencial

d<sub>1-14</sub>: Diluciones seriadas

#### 4. Prueba de inhibición de reducción de placas

Se comprobó la actividad inhibitoria de la mezcla 1 (tween 80, etanol) y la mezcla 2 (tween – 80, etanol y aceite esencial) en 2 placas de 24 pozos (Fig. 23). Se obtuvo que la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia alba* contra ZIKV se encuentra a una concentración de 13.36 µg/ml inhibiéndolo en un 79.44% (Fig.23) mediante la prueba de inhibición de reducción de placas (Tabla 7).

Tabla 7: Inhibición contra ZIKV

	Concentración del aceite esencial	Nº de placas por pozo (UFP/ml)	Mezcla1 (UFP/ml)	Mezcla 2 (UFP/ml)
d <sub>1</sub>	167 µg/ml	18	0	0
d <sub>2</sub>	83.5 µg/ml	18	0	0
d <sub>3</sub>	41.75 µg/ml	18	0	0
d <sub>4</sub>	20.88 µg/ml	18	12.85	2.6
d <sub>5</sub>	13.36 µg/ml	18	18	3.7
d <sub>6</sub>	10.44 µg/ml	18	18	4.9
d <sub>7</sub>	8.02 µg/ml	18	18	7.3
d <sub>8</sub>	5.22 µg/ml	18	18	8.7
d <sub>9</sub>	4 µg/ml	18	18	18
d <sub>10</sub>	2.61 µg/ml	18	18	18
d <sub>11</sub>	1.3 µg/ml	18	18	18
d <sub>12</sub>	0.65 µg/ml	18	18	18



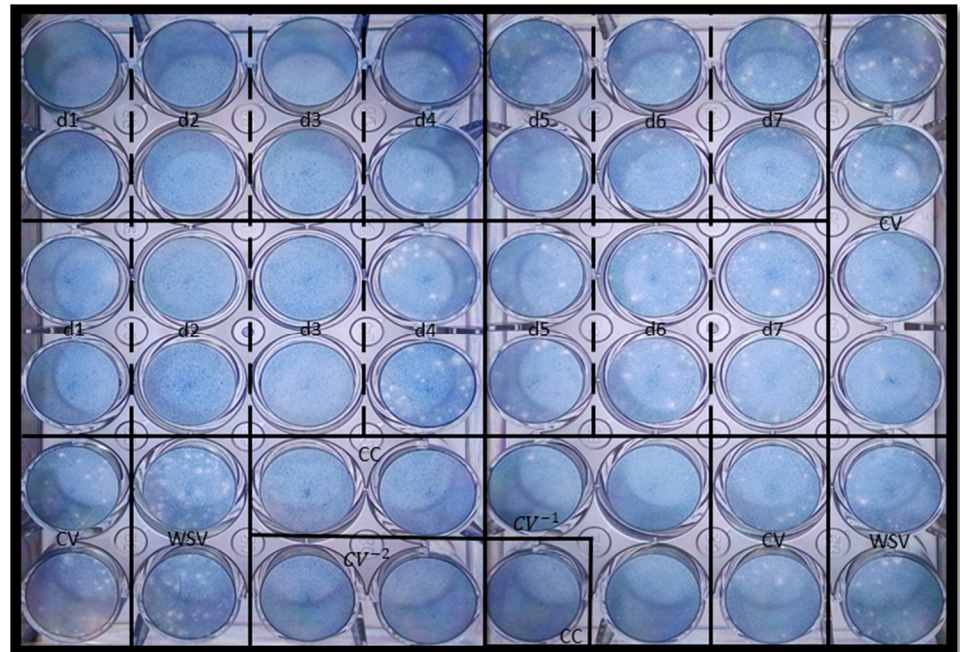


Fig. 23: Evaluación de la prueba de inhibición de reducción de placas de la mezcla 2 con tween – 80, etanol y aceite esencial (superior) y la mezcla 1 con tween – 80 y etanol (inferior) contra ZIKV.

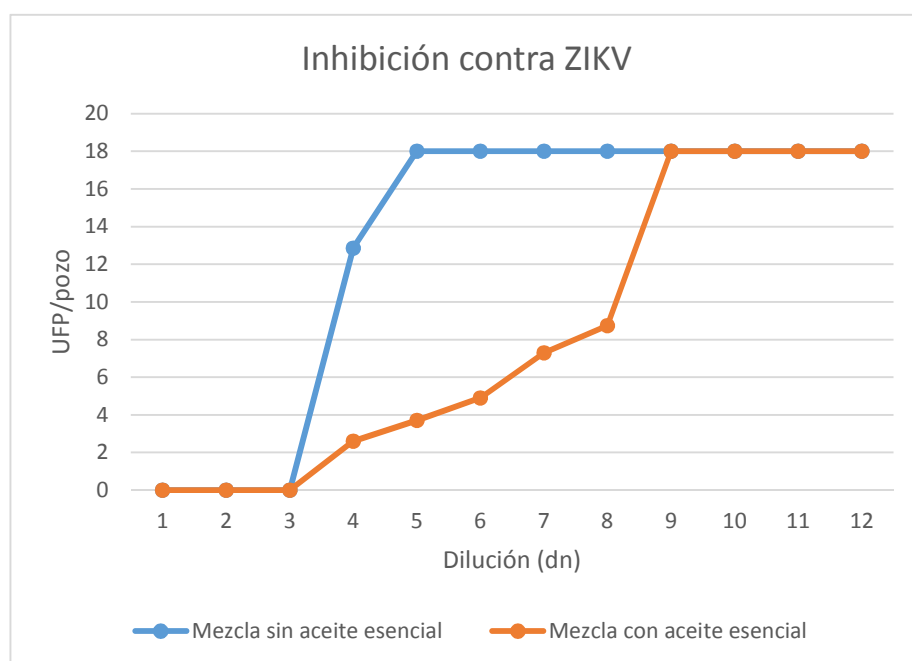


Fig. 24: Se determina el punto de quiebre en el cual el etanol deja de inhibir ZIKV; sin embargo, el aceite esencial de *Lippia alba* continúa su actividad inhibitoria contra ZIKV hasta que deja de inhibir a una concentración de 4 µg/ml. Ver (Tabla 7).



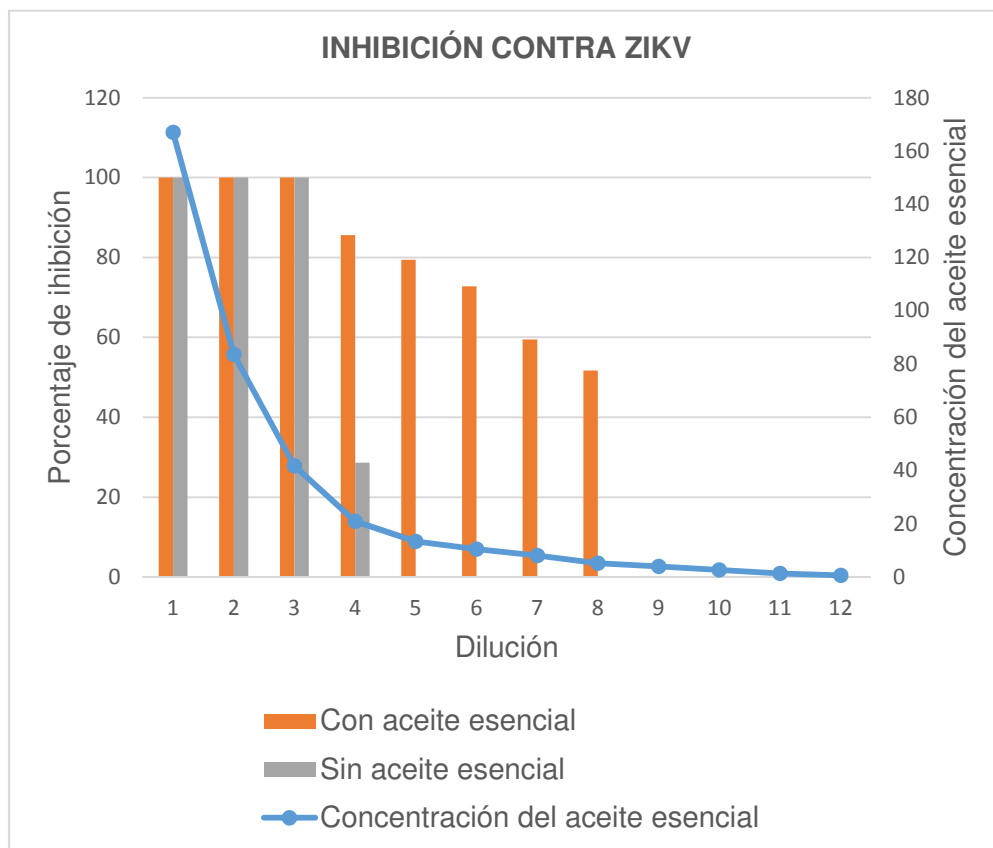


Fig. 25: Porcentaje de inhibición de la muestra M1 (Sin aceite esencial) y la muestra M2 (Con aceite esencial) en base a la concentración del aceite esencial (AE) de *Lippia alba*. Ver (Tabla 7)

En la gráfica. se observa la muestra M1 compuesta de etanol y tween – 80 deja de inhibir ZIKV y sigue actuando la otra muestra M2 que contiene aceite esencial de *Lippia alba*. El aceite deja de inhibir a una concentración de 4 μg/ml. Ver (Tabla 7).

## 5. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Minitab 17 y el método estadístico utilizado fue el Test de Rango con signos Wilcoxon para variables no paramétricas (Tabla 8)

Tabla 8: Porcentaje de inhibición de M1 y M2

Concentración μg/ml	INHIBICIÓN			
	M1		M2	
	Placas	%	Placas	%
20.88	12.85	28.57	2.6	85.71
13.36	18	0	3.7	79.44
10.44	18	0	4.9	72.86
8.02	18	0	7.3	59.44
5.22	18	0	8.7	51.43

Aplicando el test de rangos con signos de Wilcoxon con una confianza del 95% se obtuvo un valor  $p = 0.059$ . Concluyendo que no existe diferencia significativa entre los resultados de la M1 y M2.

## IX. DISCUSIÓN

Diferentes autores que trabajaron con modelos animales para ZIKV como Cugola (2017) y Lazear (2016) al propagar ZIKV en las líneas celulares con C6/36 y C6/36 y VERO, respectivamente; no especificaban el por qué preferían propagar con esas líneas celulares. Con los datos obtenidos se determinó que la mejor propagación en tiempo de incubación y título de ZIKV se dio en la línea celular C6/36 ya que obtuvo su efecto citopático de tres cruces (ECP 3+) al 3<sup>er</sup> día post infección y con un título viral de  $9.8 \times 10^6$  UFP/ml; a comparación, de la Línea celular VERO – 76 que obtuvo su ECP 3+ al 5<sup>to</sup> día con un título viral de  $2.6 \times 10^4$  UFP/ml. esto demuestra la buena adaptabilidad que tiene ZIKV hacia las células eucariotas de la línea celular C6/36, ya que al provenir de unos de los vectores principales de ZIKV tiene una mayor afinidad en la replicación viral. Sin embargo, este cambio de generación de líneas celulares (vector – humano – vector ó C6/36 – VERO76 – C6/36) como bien menciona Haddow (2012) generaría una variación genética de ZIKV ganando o perdiendo secuencias nucleotídicas o aminoacídicas; debido a que sus proteínas ligantes cambiarían constantemente de receptor y en algún momento generaría un cambio genético. Es recomendable trabajar las pruebas *in vitro* para ZIKV realizando el menor número de pasaje posibles para poder tener una semilla viral lo más parecido genéticamente a la cepa circulante

ZIKV al ser un virus emergente se necesita conocer las mejores metodologías para un mejor diagnóstico; por ende, al no tener un manual de plaqueo definido para ZIKV se optó por seguir las metodologías empleadas por otros autores para otros virus. Por ello, se decidió comparar 2 tipos de overlayers (método semi – sólido y el método sólido) para definir cuál de estas 2 metodologías brinda una mejor cuantificación para ZIKV. Juárez (2013) comparó las 2 metodologías (sólido y semisólido) en las líneas celulares VERO – 76 y BHK –

21 para alphavirus demostrando que con el método sólido se obtuvo una mayor titulación viral; Roehrig (2008) usó el método semisólido como overlayer determinando que son aceptables carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC) y agarosa; siempre y cuando no contenga inhibidores ya que pueden inhibir la formación de placas (UFP); Henderson (1959) usó el método sólido con agarosa al 1% para la titulación del virus West Nile, St Louis y Encefalomiелitis equina del Este; y Thomas (2009) investigó sobre qué línea celular y método de plaqueo es óptimo para los cuatro serotipos de virus Dengue. Con esto se demuestra que es necesario tener una buena metodología de plaqueo y buen overlayer para tener datos más exactos para ZIKV; debido, a que cada virus tiene un comportamiento distinto con cada línea celular y método de plaqueo. En esta investigación, la titulación viral se hizo comparando dos tipos de overlayer (método semisólido o CMC al 3% y el método sólido o agarosa al 0.9%) con el fin de encontrar un overlayer ideal para ZIKV. Con el método sólido se obtuvo una concentración viral de  $3 \times 10^6$  UFP/ml a comparación del método semisólido que obtuvo una concentración viral de  $3.2 \times 10^5$  UFP/ml; determinando que gracias al método sólido se obtuvo un mayor espectro de cuantificación de partículas virales, esto debido a que al tener un overlayer sólido rico en agarosa y con una electroendosmosis baja sobre la monocapa celular nos ofrece que la difusión del virus a otras células y la formación de la placa sean limitadas.

Para la prueba de inhibición de reducción de placas se debe garantizar que el aceite esencial no genere citotoxicidad en la línea celular VERO- 76 ya que esto generaría un falso positivo en las Unidades Formadoras de Placas (UFP) o mataría por completo la monocapa celular generando un gasto económico y una pérdida de tiempo; por ende, se busca encontrar concentración no citotóxica para la línea celular VERO – 76. Por ello, autores como Ocazones

(2010) y Meneses (2009) determinaron que evaluando la citotoxicidad del aceite esencial de *Lippia alba* en la línea celular VERO – 76; se encuentra a una concentración no citotóxica de 139.5 µg/m (Ocazonez, 2010) y 90±15.98 µg/ml (Meneses, 2009) ambas en Colombia. En esta investigación, se evaluó que la especie extraída de la comunidad de Miraflores obtuvo una concentración no citotóxica de 167 µg/ml usando la línea celular VERO – 76. Con esto se demuestra que la especie extraída en el departamento de Amazonas es menos citotóxica en la línea celular VERO – 76 que sus pares colombianos. Esto quizás se deba al tipo de hábitat que se encuentra en nuestra región de ceja de selva, ya que no es un suelo tan rico como en otras regiones de la costa o la sierra peruana. Y para determinar el porqué de esta diferencia se necesitaría un reporte específico del tipo de suelo del cual extrajeron la planta los otros autores mencionados. Además, de encontrar una correlación entre la capacidad citotóxica del aceite esencial de *Lippia* y los factores ambientales que la rodean. Por otro lado, se hizo un estudio comparativo en la cual se evaluó el aceite esencial de *Lippia alba* en las líneas celulares C6/36 *Aedes albopictus* y VERO – 76 obteniendo que la concentración no citotóxica del aceite esencial de *Lippia alba* se encuentra a 402 µg/ml y 167 µg/ml, respectivamente; demostrando que la línea celular C6/36 tiene una mayor resistencia citotóxica a comparación de la línea celular VERO – 76. Esto debido a que quizás uno de los componentes químicos del aceite esencial de *Lippia* genere muerte celular.

Al no encontrarse un trabajo de antivirales relacionados a ZIKV se optó por seguir los criterios metodológicos de otros autores quienes hayan trabajado con flavivirus como Meneses (2009) quien probó la actividad antiviral del aceite esencial de *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Oreganum vulgare* y *Artemisia vulgaris* contra el virus de Fiebre Amarilla (YFV) y Duschatzky (2005) quien

probó la actividad antiviral del aceite esencial de plantas aromáticas contra virus Herpes simple tipo – 1 (HSV – 1), virus Dengue tipo 2 (DENV – 2) y virus Junín (JUNV). En esta investigación se determinó que la actividad inhibitoria de *Lippia alba* contra ZIKV es de 79.44% a una concentración de 13.36 µg/ml de aceite esencial. Demostrando que usando la prueba de inhibición de reducción de placas supera el PIRP<sub>75</sub> o 75 % de reducción de unidades formadoras de placas (UFP). Ante la ausencia de agente antivirales (Álvarez Escobar, 2018) y la prueba de vacunas que se encuentran en ensayos clínico fase 3 (Roth, 2018); con este dato se reporta que la especie *Lippia alba* es un buen antiviral contra ZIKV. Sin embargo, falta fraccionar el aceite esencial para determinar que compuesto químico o si es que actúan en sinergia los componentes químicos son los encargado de realizar el docking molecular.

ZIKV es un virus emergente, que genera un grave problema de salud pública en neonatos cuyas madres fueron contagiadas las primeras semanas de embarazo; manifestándose microcefalia, síndromes congénitos, entre otros. Por ello, al no tener una guía para el manejo de ZIKV en laboratorio es necesario conocer su comportamiento viral en las distintas líneas celulares. Por ello, según reportes como el MINSA (2018) y Cugola (2017), manifiestan que el día óptimo de infección para ZIKV es a partir del 5<sup>to</sup> día en el cuadro clínico de los pacientes e *in vitro*, respectivamente. Por ello, se corrobora *in vitro* la evidencia de la presencia de pequeñas Unidades formadoras de placas (UFP) a partir del 5<sup>to</sup> día; aunque queda demostrado que al 6<sup>to</sup> día evidencia una mayor adaptabilidad observados en sus UFP bien definidas. Esto indicaría que posiblemente se trate del mismo genotipo. Por otro lado, se obtuvo que a partir del pasaje viral N°4 las UFP son más definidas, más grandes y evidencian efecto citopático.

Biológicamente, hay diferencia entre la M1 (no contiene el aceite esencial) y la M2 (sí contiene el aceite esencial); sin embargo, estadísticamente el resultado no es significativo ( $p < 0.059$ ) esto puede deberse a la poca población muestral ( $N = 6$ ) que se eligió para determinar la inhibición del aceite esencial de *Lippia alba* contra ZIKV.

## **X. CONCLUSIONES.**

La línea celular C6/36 propagó en poco tiempo y a una alta concentración ZIKV.

El método sólido obtuvo una mayor cuantificación de ZIKV.

La línea celular C6/36 y VERO – 76 tienen una mayor resistencia citotóxica al aceite esencial de *Lippia alba* a una concentración de 0.402 mg/ml y 0.167 mg/ml, respectivamente.

El aceite esencial de *Lippia alba* inhibió en un 79.44% la actividad viral de ZIKV a una concentración de 10.4375 µg/ml.

El plaqueo óptimo de ZIKV es a una concentración de  $1.25 \times 10^5$  cel/ml.

ZIKV se adaptó a la línea celular VERO – 76 en el pasaje viral 4 (PV – 4).

El día óptimo de coloración de ZIKV es al 6<sup>to</sup> día post-infección a 37°C.



## **XI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda hacer más pruebas para la comparación entre las metodologías del método sólido y semisólido con el fin de validar esta experiencia. Además de probar la actividad antiviral del aceite esencial de *Lippia alba* contra otros virus como Dengue, Fiebre Amarilla, Chikungunya, etc.; ya que son virus reemergentes y muy agresivos en la población peruana. También recomiendo probar otras plantas con propiedades antivirales contra ZIKV para tener una mayor diversidad de compuestos químicos inhibitorios contra ZIKV u otros flavivirus. Por otro lado, se debería de hacer el fraccionamiento del aceite esencial crudo de *Lippia alba* para determinar mediante docking molecular qué compuesto o compuestos químicos dentro del aceite esencial inhiben el mecanismo de acción de ZIKV; Además, recomiendo probar la actividad inhibitoria del aceite esencial con otras técnicas de detección como PRNT, focos fluorescentes, entre otros. Finalmente, se recomienda hacer más diluciones de la M1 (sin aceite esencial) y la M2 (con aceite esencial); con el fin de obtener un mayor número de diluciones entre los rangos en donde se evidencia la inhibición del aceite esencial para un mejor análisis de la población muestral.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- Albarracín Montoya, G. C., & Gallo Palma, S. G. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales).
- Álvarez Vera, M., González Rodríguez, A., Díaz Morejón, D., Morier Díaz, L., & Guzmán Tirado, M. G. (2010). Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(2), 138-137.
- Amber, R., Adnan, M., Tariq, A., & Mussarat, S. (2017). A review on antiviral activity of the Himalayan medicinal plants traditionally used to treat bronchitis and related symptoms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(2), 109-122.
- Ashraf, A., Mahboob, S., Andleeb, R., Ijaz, M. U., & Shah, M. S. (2018). Status updates of Newcastle disease and amelioration effects of medicinal plants against Newcastle disease virus: A review. *Acta virologica*, 62(1), 3-15.
- Aspilcueta-Gho, D., Benites Villafane, C., Sánchez, C., Menel, M., Yberico, C., & Gilmer, J. (2017). Infección por zika en el Perú: de amenaza a problema de salud. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 63(1), 57-64.
- Aymard, G. (2005). Verbenaceae. *Flora of the venezuelan Guayana*, 9, 407-445.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35(3), 235.

- Bell, T. M., Field, E. J., & Narang, H. K. (1971). Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 35(2-3), 183-193.
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, 19(13), 20751.
- Betancur-Galvis, L. A., Morales, G. E., Forero, J. E., & Roldan, J. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 541-546.
- Boletín Epidemiológico Nacional SE 52-2016 – Dirección General de Epidemiología Volumen 25 – Semana Epidemiológica N52° Diciembre 2016. ISSN versión electrónica: 2415-0762. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/52.pdf>.
- Byler, K. G., Ogungbe, I. V., & Setzer, W. N. (2016). In-silico screening for anti-Zika virus phytochemicals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 69, 78-91.
- Cáceres – Mejía, B. (2018). Situación epidemiológica de Zika en gestantes y seguimiento de sus recién nacidos, Perú hasta el SE 33 – 2018. *Boletín Epidemiológico del Perú*. 27 (33): 750 – 754
- Cáceres – Mejía, B. 2018. Zika en gestantes y seguimiento de sus recién nacidos: lecciones aprendidas para el sistema de vigilancia peruano. *Boletín Epidemiológicos del Perú*; 27 (29: 651 – 652
- Camillo, F. D. C. (2016). *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Cerpa, M., Mato, R., & Cocero, M. (2007). Hidrodestilacion de aceites esenciales. Modelado y caracterización. *AIChE Journal*, 54(4), 909-917.

- Chen, F., Xu, M., Yang, X., Liu, J., Xiao, Y., & Yang, L. (2018). An improved approach for the isolation of essential oil from the leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* using microwave-assisted hydrodistillation concatenated double-column liquid-liquid extraction. *Separation and Purification Technology*, 195, 110-120.
- Chiow, K. H., Phoon, M. C., Putti, T., Tan, B. K., & Chow, V. T. (2016). Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(1), 1-7.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D. & Failloux, A. B. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004543.
- Cohen, B. J., Doblas, D., & Andrews, N. (2008). Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. *Vaccine*, 26(50), 6392-6397.
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L., Guimarães, K. P. & Polonio, C. M. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267.
- Day, M. D., & McAndrew, T. D. (2003). The biology and host range of *Falconia intermedia* (Hemiptera: Miridae), a potential biological control agent for *Lantana camara* (Verbenaceae) in Australia. *Biocontrol Science and Technology*, 13(1), 13-22.
- De Abreu Matos, F. J., Machado, M. I. L., Craveiro, A. A., & Alencar, J. W. (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 8(6), 695-698.

- Dias, Í. K. R., Sobreira, C. L. D. S., Martins, R. M. G., Santana, K. F. S., Lopes, M. D. S. V., Joventino, E. S., & Viana, M. C. A. (2018). Zika virus:-a review of the main aspects of this type of arbovirosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(3), 261-269.
- Dick, G. W. A. (1952). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 521-534.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 509-520.
- Dirección General de Epidemiología (2016) Plan Nacional de Preparación y Respuesta Frente a la Enfermedad por el virus Zika. Ministerio de Salud. Documento técnico. Perú
- Do Vale, T. G., Furtado, E. C., Santos Jr, J. G., & Viana, G. S. B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Phytomedicine*, 9(8), 709-714.
- Dowall, S. D., Graham, V. A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R. J. & Hewson, R. (2016). A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004658.
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S. & Guillaumot, L. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536-2543.
- Duschatzky, C. B., Possetto, M. L., Talarico, L. B., García, C. C., Michis, F., Almeida, N. V. & Damonte, E. B. (2005). Evaluation of chemical and antiviral

properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 16(4), 247-251.

- Eiros, J. M., Pérez Rubio, A., & Bachiller, M. R. (2018). La Investigación Clínica en Vacunas: El Futuro. *Electronic J Biomed*, 1.
- Epidemiológica, A. Síndrome neurológico, anomalías congénitas e infección por virus Zika. Implicaciones para la salud pública en las Américas. 1 de diciembre de 2015. OPS/OMS. Alerta Epidemiológica.
- Flint, S. J., Rancaniello, V. R., Rall, G. G. & Skalka, A. M. (2015). Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. ASM press.
- Freshney, R. I. (2005). Biology of cultured cells. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*.
- Freshney, R. I. (2006). Basic principles of cell culture. *Culture of cells for tissue engineering*, 11-14.
- Furtado, M. N. R., Secco, R. D. S., & Rocha, A. E. S. (2012). Synopsis of species of Lamiales Bromhead occurring in the coastal strand vegetation of Pará State, Brazil. *Hoehnea*, 39(4), 529-547.
- Garcia, C. C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., & Damonte, E. B. (2003). Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(9), 1073-1075.
- Gilbert, J., De Iuliis, G. N., Tarleton, M., McCluskey, A., & Sakoff, J. A. (2018). (Z)-2-(3, 4-Dichlorophenyl)-3-(1H-Pyrrol-2-yl) Acrylonitrile Exhibits Selective Antitumor Activity in Breast Cancer Cell Lines via the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway. *Molecular pharmacology*, 93(2), 168-177.

- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of virology*, 84(20), 10438-10447.
- González Collantes, S. (2017, January). Situación epidemiológica del virus zika. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 78, No. 1, pp. 73-78). UNMSM. Facultad de Medicina.
- Goswami, D., Mukherjee, P. K., Kar, A., Ojha, D., Roy, S., & Chattopadhyay, D. (2016). Screening of ethnomedicinal plants of diverse culture for antiviral potentials.
- Guenther, E. (2013). *The Essential Oils-Vol 1: History-Origin In Plants-Production-Analysis*. Read Books Ltd.
- Gurdip, S., Rao, G. P., Kapoor, I. P. S., & Singh, O. P. (2000). Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. leaf essential oil. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22(1B), 701-703.
- Guzmán, J. (2018) Situación epidemiológica de Zika en el Perú, SE 21 – 2018. 27(21): 429 – 431.
- Haby, M. M., Pinart, M., Elias, V., & Reveiz, L. (2018). Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(6), 402.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., & Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1477.
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H., & Goma, L. K. H. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, 31(1), 57.

- Henderson, J. R., & Taylor, R. M. (1959). Arthropod-borne virus plaques in agar overlaid tube cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 101(2), 257-259.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., & Bailleul, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 211-222.
- Higa, S., de Abram, A. P., & Nicoletti, M. (1988). Estudio fitoquímico de la *Lippia Alba* (MILL) NE Br. *Revista de Química*, 2(2), 105-109.
- Hoeksema, F., Karpilow, J., Luitjens, A., Lagerwerf, F., Havenga, M., Groothuizen, M., ... & Yallop, C. (2018). Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines—A second look. *Vaccine*, 36(16), 2093-2103.
- Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. (2013). Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización del virus dengue. Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba
- Jiang, S., Wang, L. W., Walsh, M. J., Trudeau, S. J., Gerdt, C., Zhao, B., & Gewurz, B. E. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphoblastoid B-Cell Lines. *Current protocols in molecular biology*, 121(1), 31-12.
- Juarez, D., Long, K. C., Aguilar, P., Kochel, T. J., & Halsey, E. S. (2013). Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. *Journal of virological methods*, 187(1), 185-189.
- Kadir, S. L. A., Yaakob, H., & Zulkifli, R. M. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *Journal of natural medicines*, 67(4), 677-689.
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), 675.



- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S. & Lok, S. M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425.
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Shearer, F. M., Brady, O. J., & Coelho, G. E. (2015). The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific data*, 2, 150035.
- Kulkarni, S. R., & Sanghai, N. N. (2014). Screening Of Antiviral Compounds From Plants-A Review. *Journal of Pharmacy Research* Vol, 8(8), 1050-1058.
- Kuno, G., & Chang, G. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*, 152(4), 687-696.
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & Signor, L. D. C. C. (2016). Phylogeny of Zika virus in western hemisphere, 2015. *Emerging infectious diseases*, 22(5), 933.
- Lazear, H. M., Govero, J., Smith, A. M., Platt, D. J., Fernandez, E., Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2016). A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell host & microbe*, 19(5), 720-730.
- Liu, Y., Liu, J., Du, S., Shan, C., Nie, K., Zhang, R., & Wang, P. (2017). Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*, 545(7655), 482.
- Lugones Botell, M., & Ramírez Bermúdez, M. (2016). Infección por virus zika en el embarazo y microcefalia. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 42(3), 398-411.
- Maeda, A., & Maeda, J. (2013). Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *The Veterinary Journal*, 195(1), 33-40.

- Méndez Brito, M., Alcalde Rojas, J. M., González Gámez, S., & Fernández Toledo, A. G. (2017). Algunas especificidades sobre la enfermedad por el virus del Zika. *MediSan*, 21(02), 243-253.
- Meneses, R., Ocazonez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 8.
- Meneses, R., Torres, F. Á., Stashenko, E., & Ocazonez, R. E. (2009). Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3).
- Ministerio de Salud – MINSA (2016) Plan Nacional de preparación y respuesta frente a la enfermedad por el virus Zika – Perú, 2016. Ministerio de Salud del Perú.
- Ministerio de Salud – MINSA. (2016). Alerta Epidemiológica: Intensificación de la transmisión del virus Zika en las Américas y el riesgo de su introducción al Perú. Dirección General de Epidemiológica. Perú.
- Moore, D. Á., Causey, O. R., Carey, D. E., Reddy, S., Cooke, A. R., Akinkugbe, F. M., & Kemp, G. E. (1975). Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 69(1), 49-64.
- Mott, G. O., & Jiménez, C. (1979). *Manual para la colección, preservación y caracterización de recursos forrajeros tropicales*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Munir, A. A. (1993). A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houst. ex] Linn.(Verbenaceae) in Australia. *Journal of the Adelaide Botanic Garden*, 129-145.

- Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304-309.
- Okhale, S. E., Nwanosike, E. M., Fatokun, O. T., & Kunle, O. F. (2016). Phytochemistry and ethnopharmacology of Lippia genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. *International Journal of Pharmacognosy*, 3(5), 201-211.
- Olson, J. G., & Ksiazek, T. G. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389-393.
- OMS/OPS, (2017). Casos acumulados de Zika.
- OMS/OPS, (2017). Infección por virus. Noticias y actualizaciones.
- OMS/OPS, (2017). Países y territorios de las Américas con casos autóctonos confirmados por virus Zika (transmisión por picadura del vector), 2015 - 2017.
- OMS/OPS, 2017. Países y territorios que notificaron transmisión autóctona en la Región de las Américas en 2015 – 2017. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11603&Itemid=41696&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11603&Itemid=41696&lang=es)
- OMS/OPS, 2017. Países y territorios que notificaron transmisión autóctona en la Región de las Américas en 2015 – 2017.
- OMS/OPS. (2015). Infección por virus Zika – 7 de mayo de 2015. Alerta Epidemiológica.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. World Health Organization.

- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika virus. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1552-1563.
- Reina, M. 2003. Técnicas de estudio de líneas celulares. Universidad de Barcelona
- Rodríguez-Ortega, M., Chumpitaz, Z., Ríos, S., Méndez, M., Méndez, J., & Cabrera, G. (2013). Actividad antiviral contra el virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, de extractos de hojas de *Taraxacum officinale* GH Weber ex Wiggers. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(4).
- Roehrig, J. T., Hombach, J., & Barrett, A. D. (2008). Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral immunology*, 21(2), 123-132.
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., & Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*, 19(41), 20929.
- Roth, C., Delgado, F. G., Simon-Lorière, E., & Sakuntabhai, A. (2018). Immune Responses to Dengue and Zika Viruses—Guidance for T Cell Vaccine Development. *International journal of environmental research and public health*, 15(2), 385.
- SCC (2000). Reports of the Scientific Committee on Cosmetology (Ninth Series). European Commission :pp. 888–895
- Segretín, M. E. (2003). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). Argen Bio.

- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2018). Effect of prebiotics on growth behavior of *Lactobacillus plantarum* and their impact on adherence of strict anaerobic pathogens to intestinal cell lines. *Journal of Food Safety*, 38(1), e12384.
- Siburian, M. D., Suriapranata, I. M., & Wanandi, S. I. (2018). Pre-S2 Start Codon Mutation of Hepatitis B Virus Subgenotype B3 Effects on NF- $\kappa$  B Expression and Activation in Huh7 Cell Lines. *Viral immunology*, 31(5), 362-370.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), 467-470.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50-64.
- Stephen, M. (1940). *A New Dictionary of Chemistry*.
- Thomas, S. J., Nisalak, A., Anderson, K. B., Libraty, D. H., Kalayanaroop, S., Vaughn, D. W., & Endy, T. P. (2009). Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(5), 825-833.
- Torres, L. T. (2011). Estudio de la hidrodestilación del aceite esencial de *Lippia alba* (mill.) NE Br., en un destilador a escala piloto. *Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander*.
- Trópicos [base de datos en Internet]. Missouri: Missouri Botanical Garden Herbarium [actualizada en 2011; acceso 18 de Julio del 2017]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/1228306>

- Trópicos [base de datos en Internet]. Missouri: Missouri Botanical Garden Herbarium [actualizada en 2011; acceso 18 de Julio del 2017]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/1228872>
- Trópicos [base de datos en Internet]. Missouri: Missouri Botanical Garden Herbarium [actualizada en 2011; acceso 18 de Julio del 2017]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/1331344>
- Trópicos [base de datos en Internet]. Missouri: Missouri Botanical Garden Herbarium [actualizada en 2010; acceso 18 de Julio del 2017]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/448667>
- Uraki, R., Hwang, J., Jurado, K. A., Householder, S., Yockey, L. J., Hastings, A. K., & Fikrig, E. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Science advances*, 3(2), e1602899.
- US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, & National Institutes of Health. (2009). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. LC Chosewood & DE Wilson.
- Vale, T. G., Matos, F. J. A., De Lima, T. C. M., & Viana, G. S. B. (1999). Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) NE Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 127-133.
- Vale, Zétola, M., De Lima, T. C. M., Sonaglio, D., González-Ortega, G., Limberger, R. P., Petrovick, P. R., & Bassani, V. L. (2002). CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*—Verbenaceae (Brazilian false melissa). *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), 207-215.
- VARGAS, B., & ELSY, N. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos.
- Vazeille, M., Dehecq, J. S., & Failloux, A. B. (2018). Vectorial status of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* of La Réunion Island for Zika virus. *Medical and veterinary entomology*, 32(2), 251-254.

- Verma, R. S., Padalia, R. C., Arya, V., & Chauhan, A. (2012). Aroma profiles of the curry leaf, *Murraya koenigii* (L.) Spreng. chemotypes: variability in north India during the year. *Industrial crops and products*, 36(1), 343-348.
- Verma, R. S., Rahman, L. U., Chanotiya, C. S., Verma, R. K., Chauhan, A., Yadav, A., & Yadav, A. K. (2010). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the serbian chemical society*, 75(3), 343-348.
- Vijayan, P., Raghu, C., Ashok, G., Dhanaraj, S. A., & Suresh, B. (2004). Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian Journal of medical research*, 120, 24-29.
- Vunjak-Novakovic, G., & Freshney, R. I. (Eds.). (2006). Culture of cells for tissue engineering (Vol. 7). John Wiley & Sons.
- Wong, P. S. J., Li, M. Z. I., Chong, C. S., Ng, L. C., & Tan, C. H. (2013). *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(8), e2348.
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y. C., Vaughan, R. C., Sankaran, B., & Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nature Communications*, 8, 14762.
- Zoghbi, M. D. G., Andrade, E. H., Santos, A. S., Silva, M. H. L., & Maia, J. G. S. (1998). Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) NE Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), 47-48.

### XIII. ANEXOS.

#### a. Figuras.

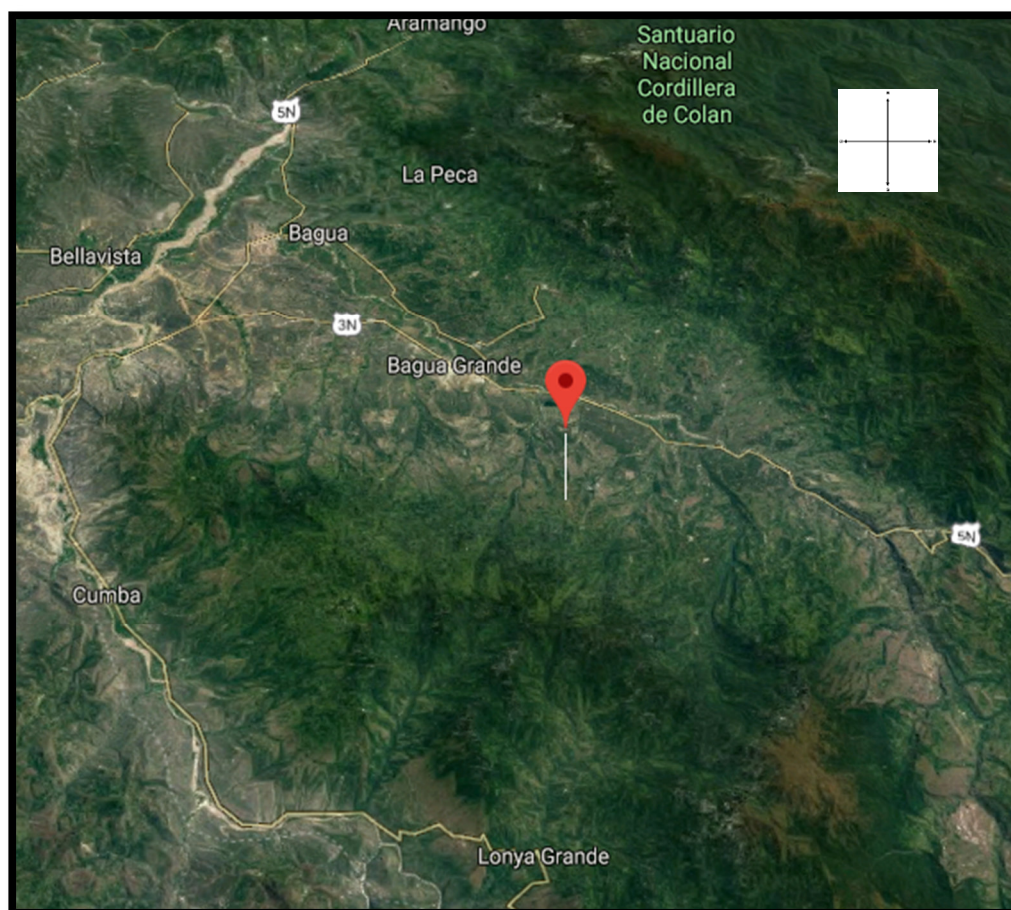


Figura 1: Lugar de Colecta.



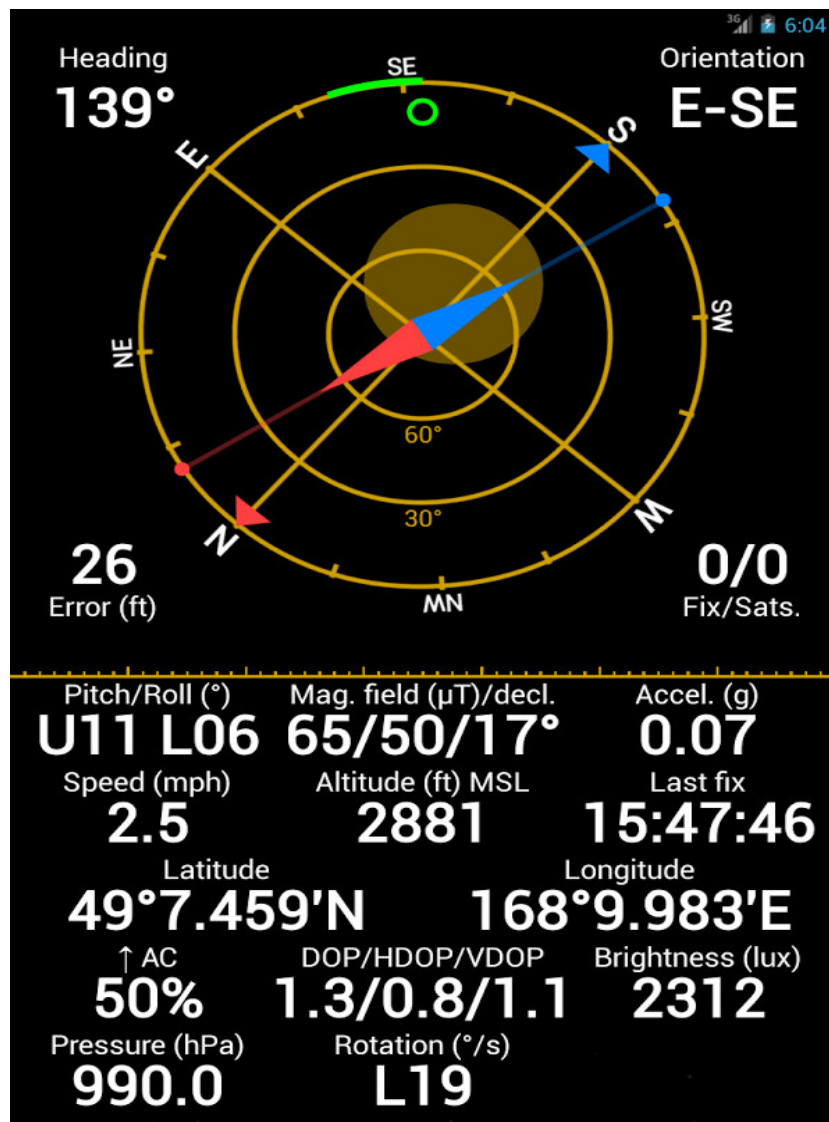


Figura 2: GPS Status & Toolbox de Android



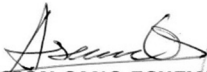
	<p align="center"> <b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b>          Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA          VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  <b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b> </p>	
<p align="center"><i>"Año del Buen Servicio al Ciudadano"</i></p>		
<p align="center"><b>CONSTANCIA N° 267-USM-2017</b></p>		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (planta completa) recibida de <b>Bernardo Esteban QUISPE BRAVO</b>, Laboratorio de Virología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Mayor de San Marcos; sido estudiada y clasificada como: <b><i>Lippia alba</i></b> (Mill.) N.E. Br. Ex Britton &amp; Wilson.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</p>		
<p><b>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</b></p>		
<p><b>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</b></p>		
<p><b>SUBCLASE: ASTERIDAE</b></p>		
<p><b>ORDEN: LAMIALES</b></p>		
<p><b>FAMILIA: VERBENACEAE</b></p>		
<p><b>GENERO: <i>Lippia</i></b></p>		
<p><b>ESPECIE: <i>Lippia alba</i></b> (Mill.) N.E. Br. Ex Britton &amp; Wilson.</p>		
<p>Nombre vulgar: "mostrán"          Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>		
<p align="right">Lima, 13 de noviembre de 2017</p>		
<p align="right">   <b>Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA</b>          JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)       </p>		
<p>ACE/ddb</p>		

Figura 3: Constancia de identificación de la planta



Figura 4: Voucher de *Lippia alba*



Fig. 5: Sistema de hidrodestilación por arrastre de vapor.





Fig.6: Material Vegetal añadido en el  
balón esmerilado



Fig.7: Extracción del aceite  
esencial de *Lippia alba*



Fig.8: Separación del aceite  
esencial de *Lippia alba*



Fig. 9: Almacenamiento

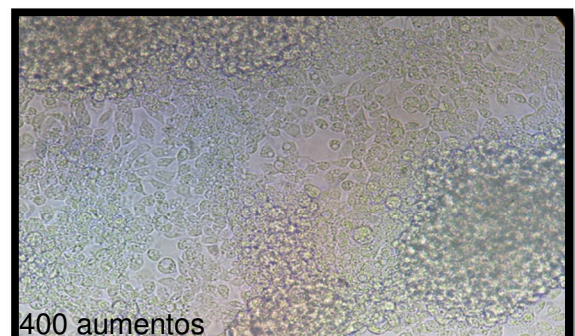
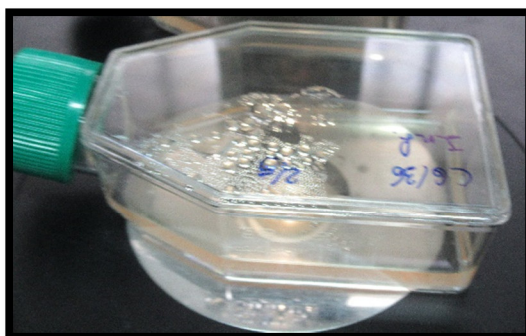
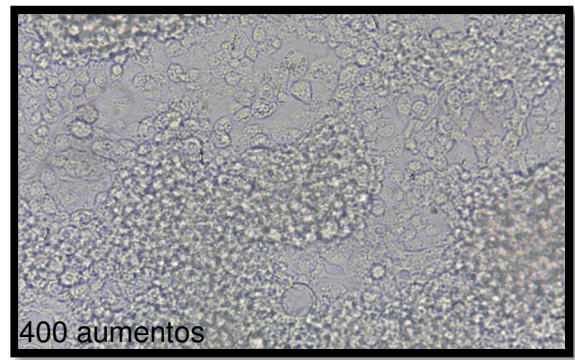
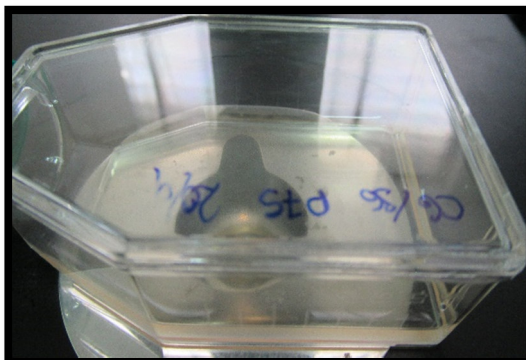
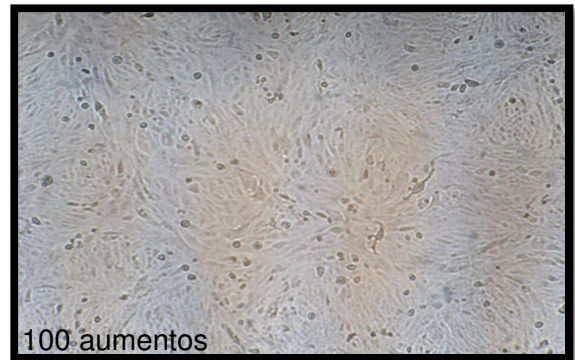
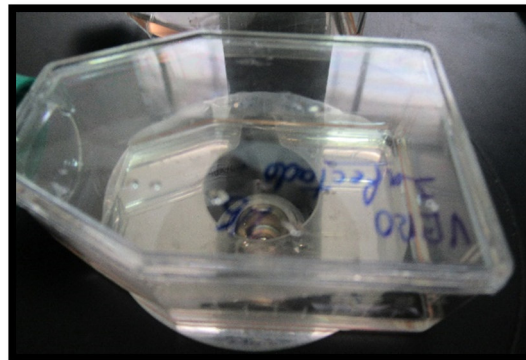
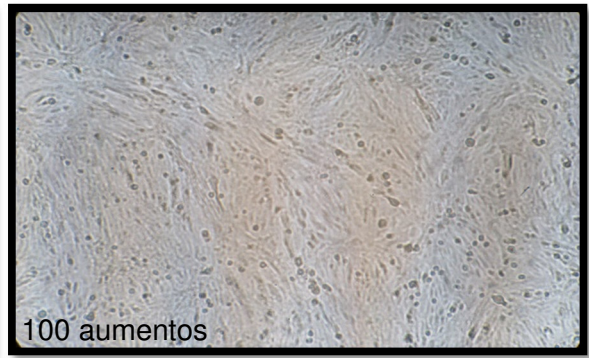
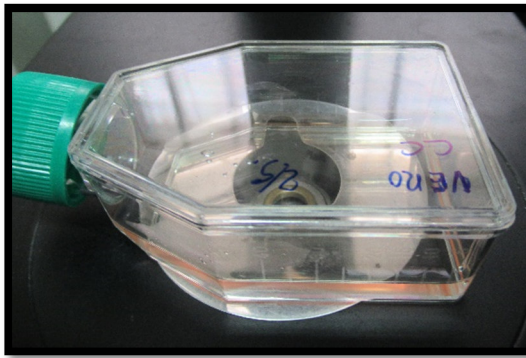


Fig. 11: Día 0 (cero) de infección de ZIKV en las líneas celulares C6/36 y Vero – 76.



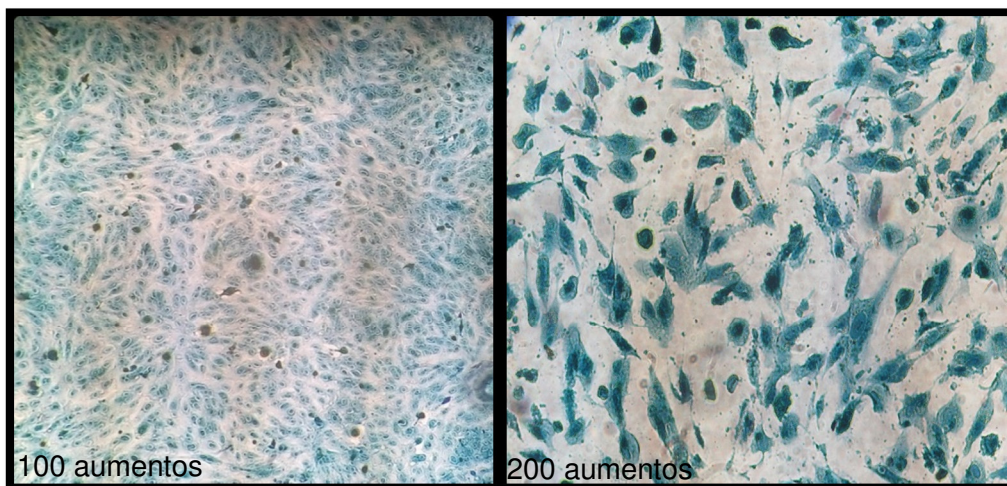


Fig.12: Se observa la línea celular VERO – 76: Control de células (Izquierda) y ECP 3+ (Derecha).

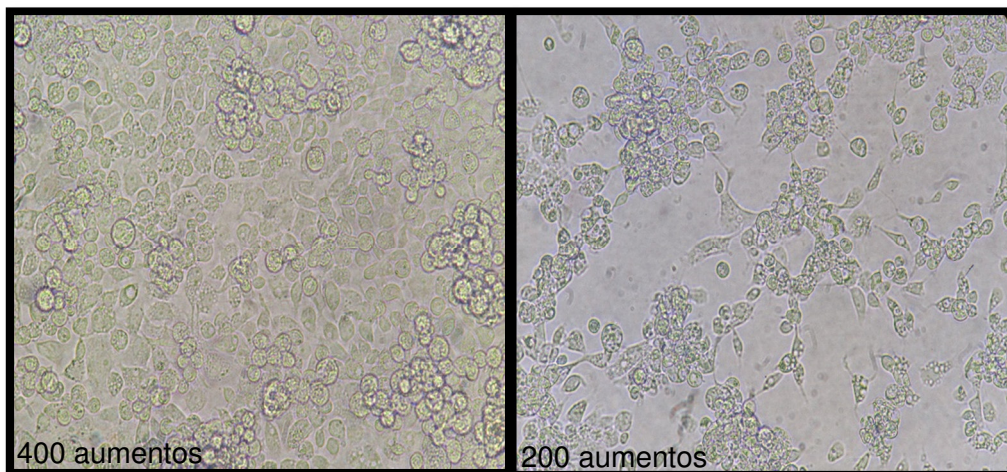


Fig.13: Se observa la línea celular C6/36: Control de células (Izquierda) y ECP 3+ (Derecha).



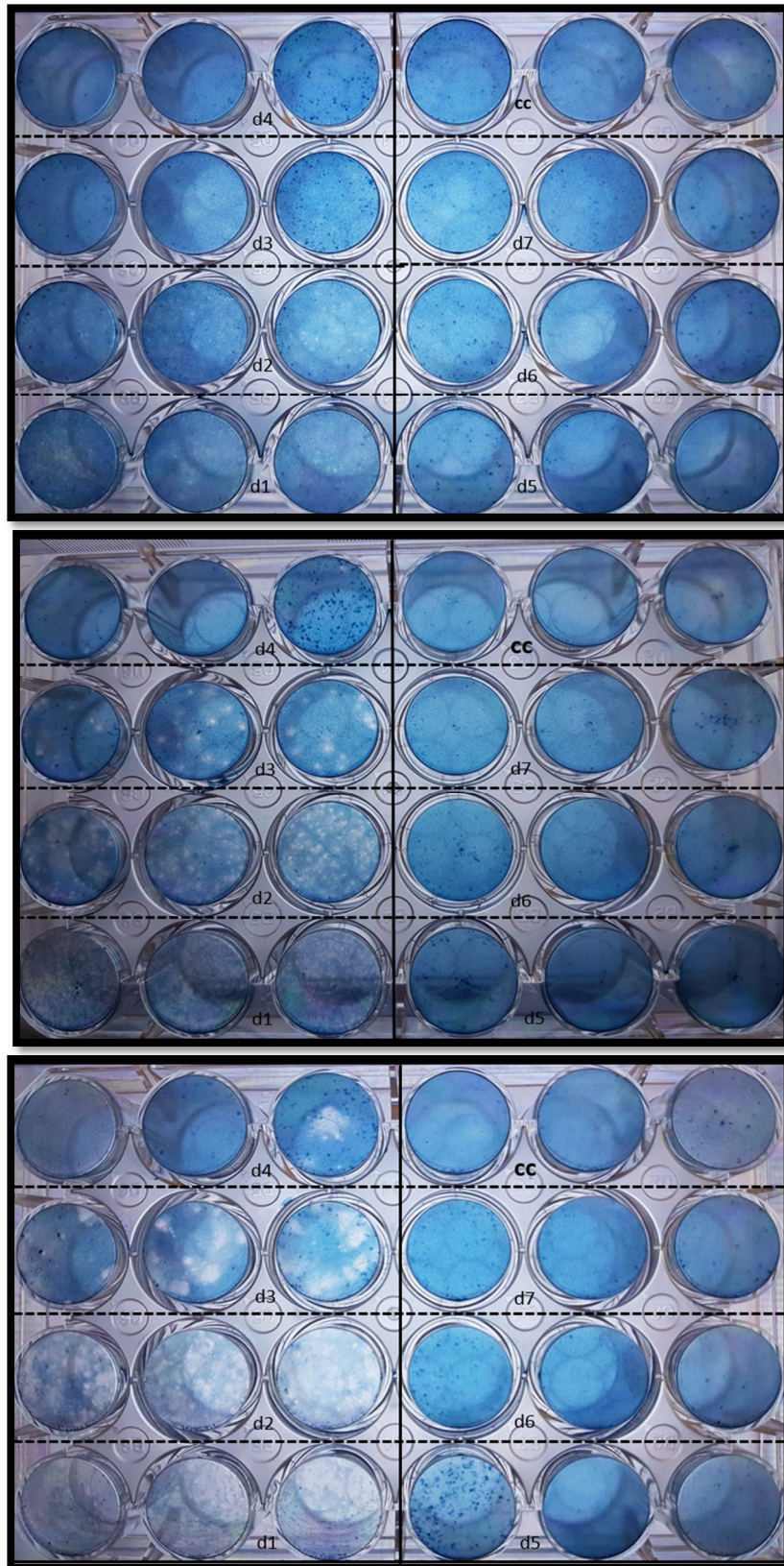


Fig.17: Coloración del día óptimo para obtener el título de ZIKV usando método sólido: La placa superior se coloreó al 5<sup>to</sup> día post-infección (DPI), la placa media se coloreó al 6<sup>to</sup> DPI y la placa inferior se coloreó al 7<sup>mo</sup> DPI.



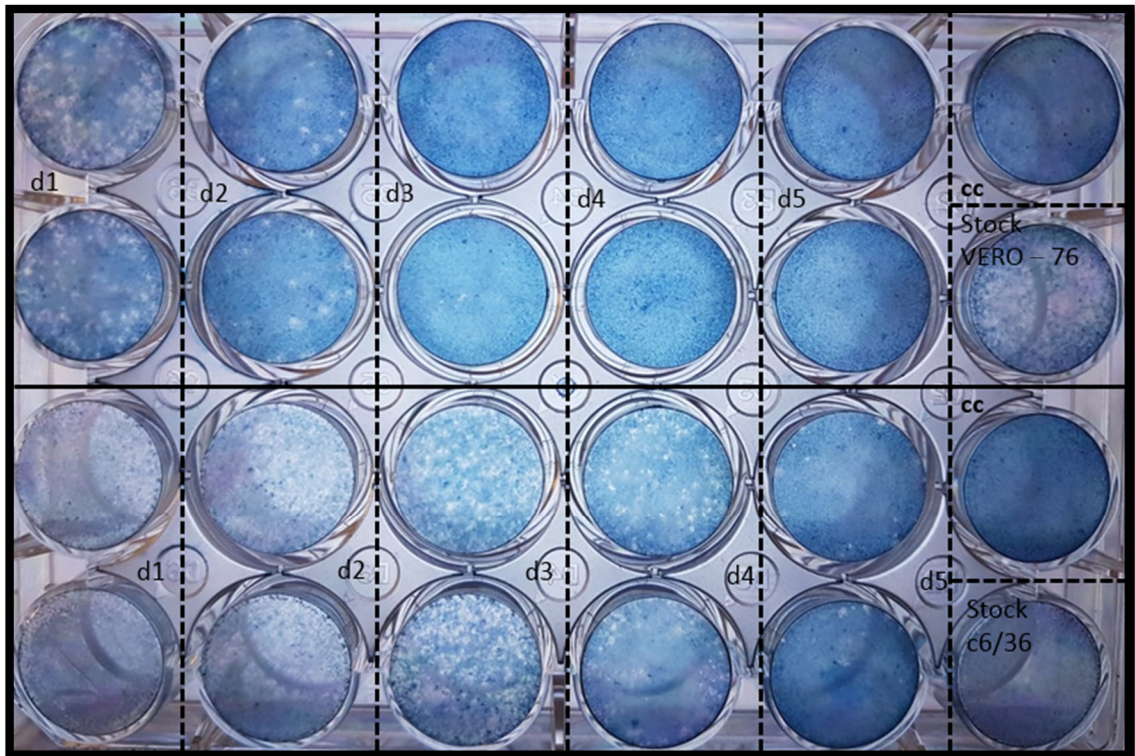


Fig.18: Método semi – sólido: Titulación de ZIKV en línea celular VERO – 76 usando las semillas virales propagadas en línea celular Vero – 76 (Superior) y C6/36 *Aedes albopictus* (Inferior). Las diluciones ( $d_n$ ) seriadas fueron de 1:10 y se mantuvo el control de células (CC).



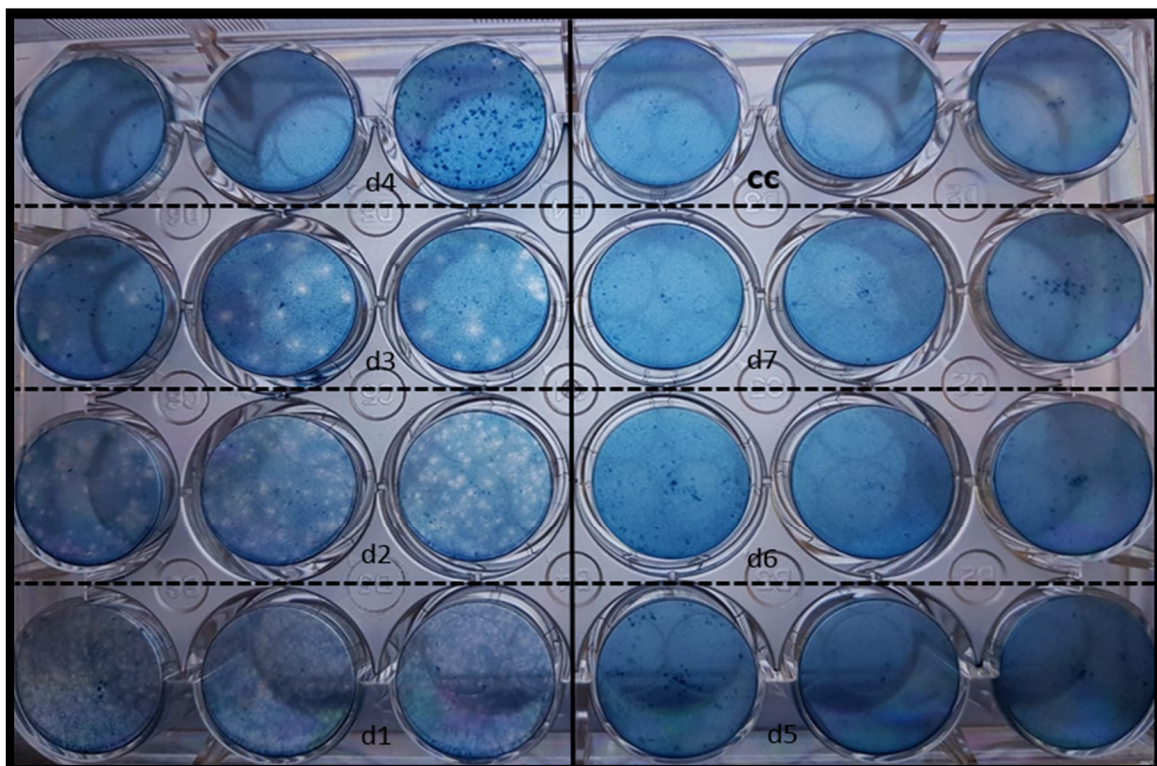


Fig.19 – a: Titulación de ZIKV en la línea celular VERO – 76 usando el método semi – sólido. Las diluciones seriadas ( $d_n$ ) en 1:10 y el control de células (CC).

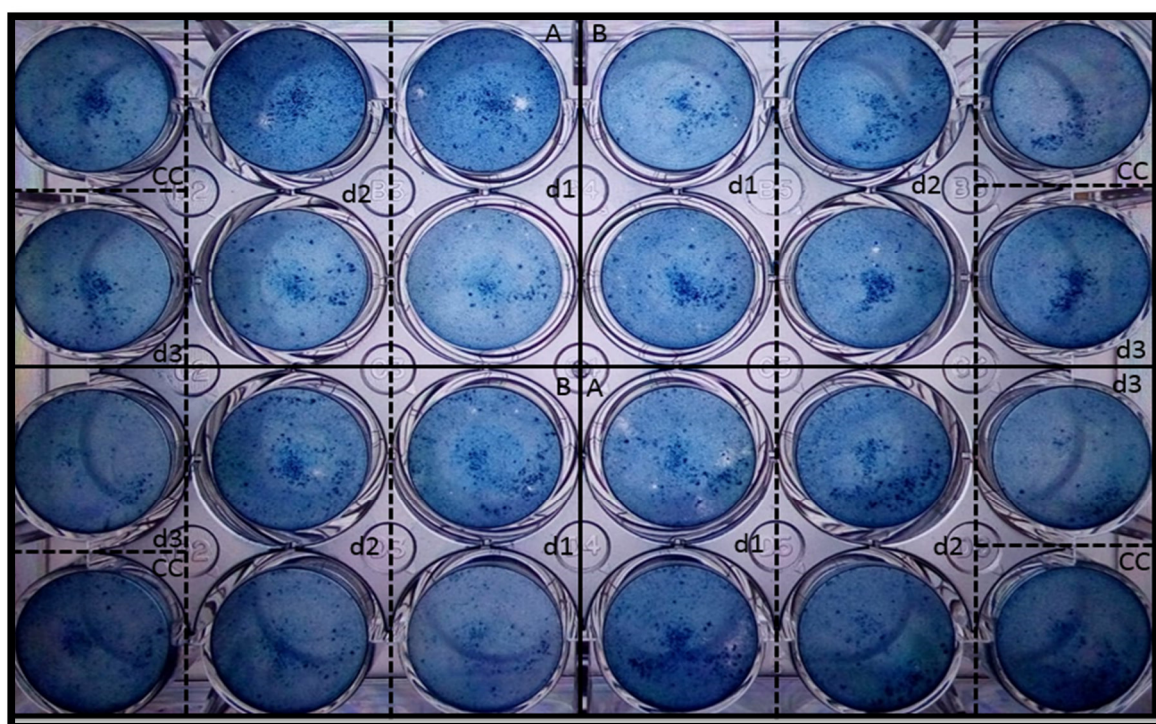


Fig.19 – b: Titulación de ZIKV en línea celular VERO – 76 usando el método sólido. Los grupos A es usando el método sólido y el grupo B es usando el método semisólido.



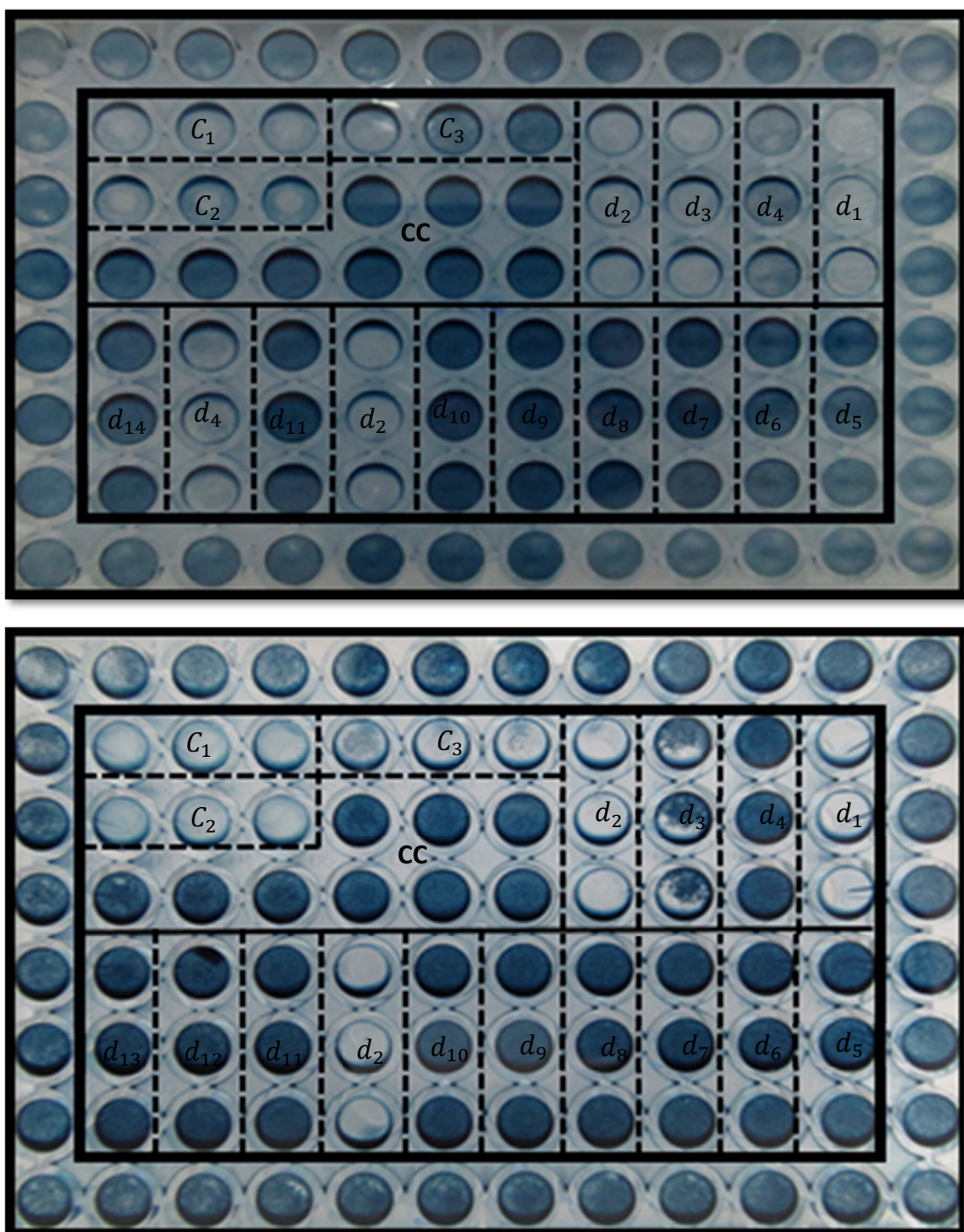


Fig. 21: Placa de citotoxicidad en VERO – 76 (Arriba) y C6/36 (Abajo).

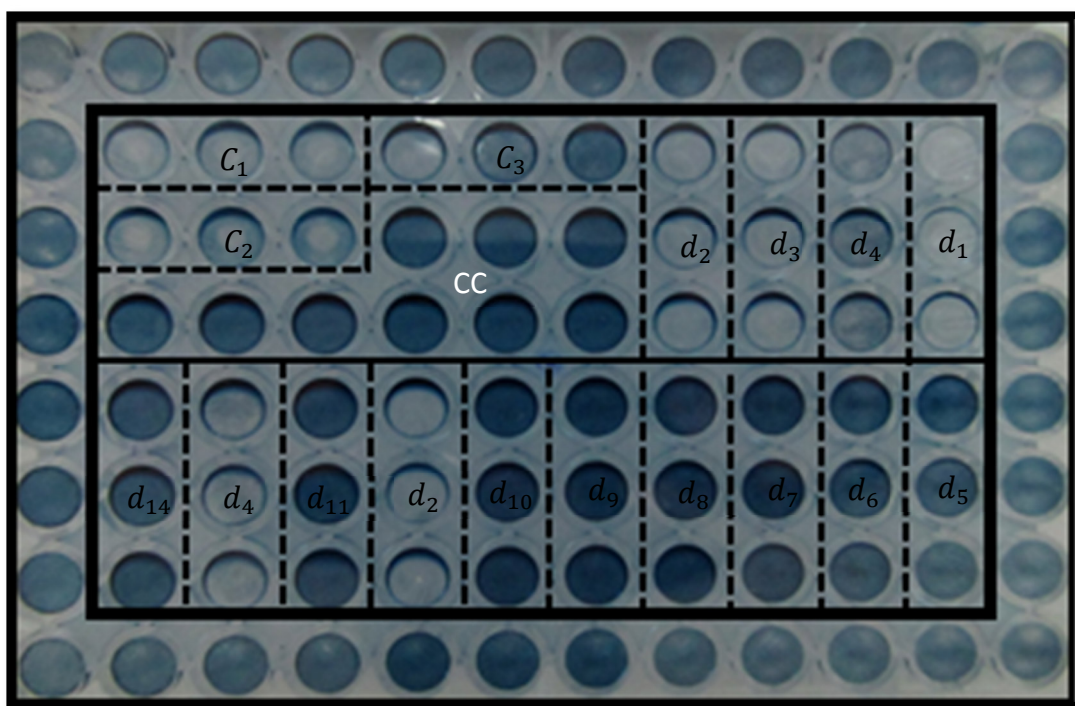


Fig. 21 – a: Placas de citotoxicidad en VERO - 76

CC: Control de células VERO – 76.

$C_1$ : Control de Tween – 80, etanol y Aceite esencial.

$C_2$ : Control de Tween – 80 y etanol.

$C_3$ : Control de aceite esencial.

$d_{1-14}$ : Diluciones seriadas.

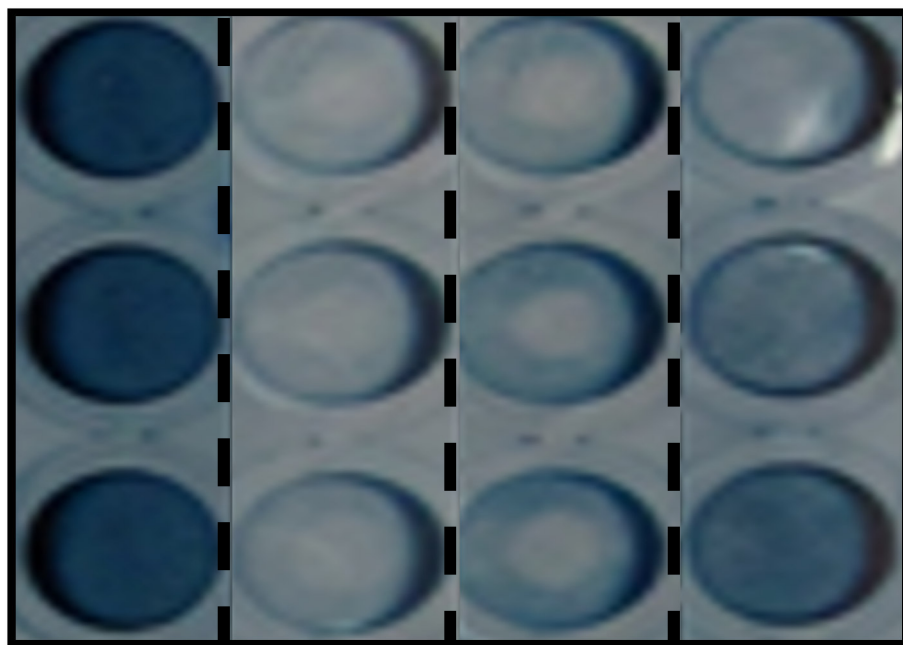


Fig. 21 – a1: De izquierda a derecha: Pozos de control de células VERO – 76 (CC); Control de tween – 80, etanol y aceite esencial ( $C_1$ ); Control de tween – 80 y etanol ( $C_2$ ); y Control de aceite esencial ( $C_3$ ),

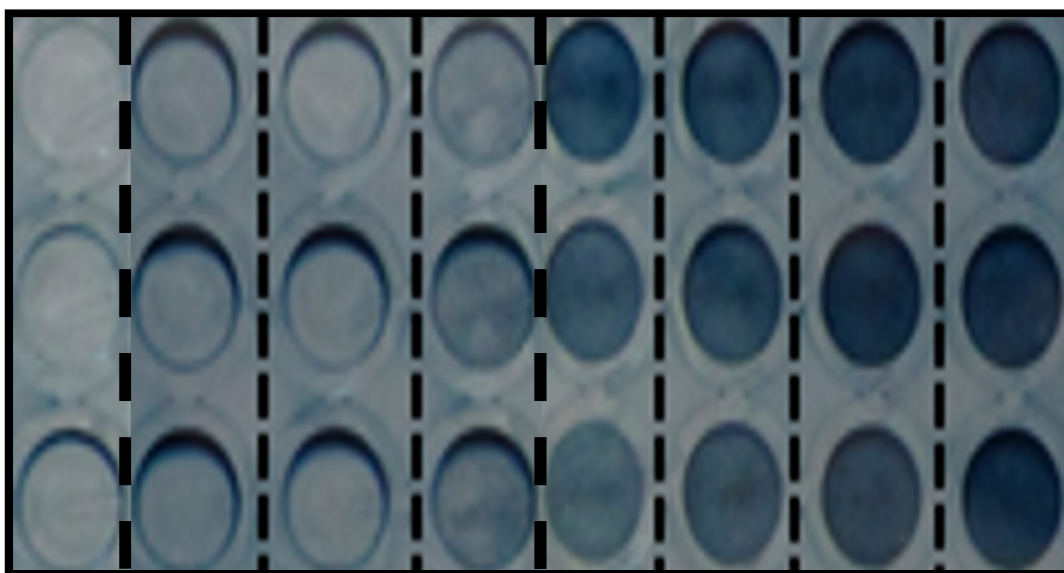


Fig. 21 - a2: De izquierda a derecha: Pozos citotóxicos y no citotóxico (última columna) en VERO – 76.



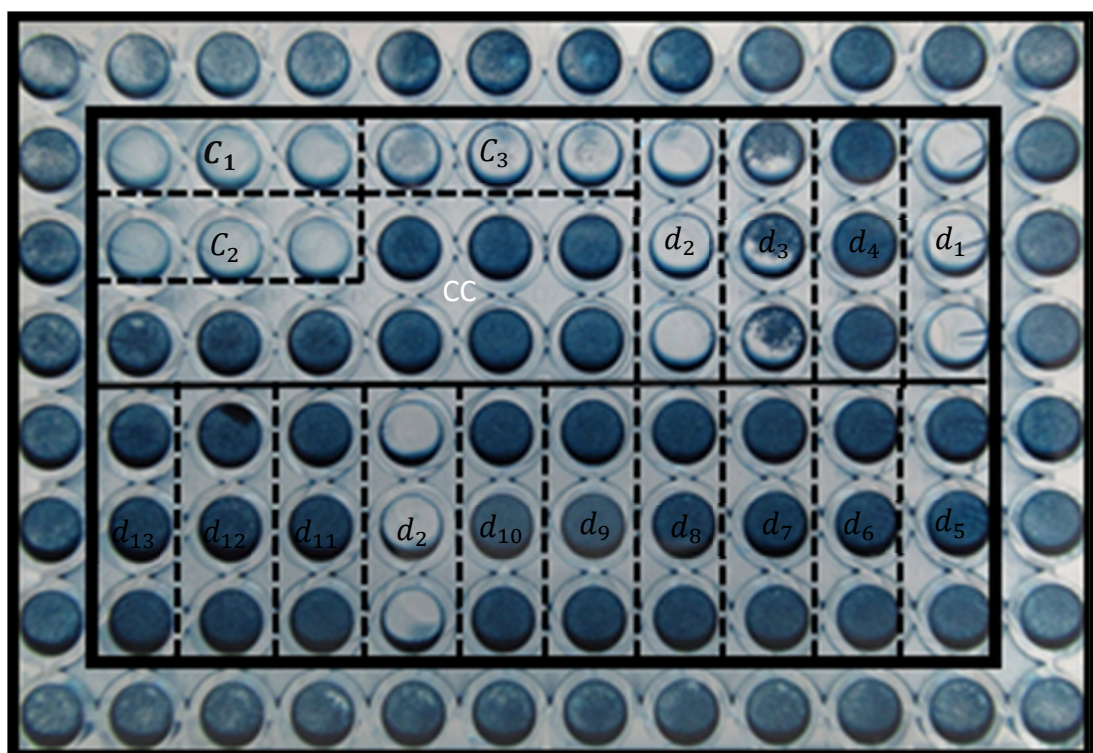


Fig. 21 – b: Placa de citotoxicidad en C6/36.

CC: Control de células C6/36

$C_1$ : Control de Tween – 80, etanol y Aceite esencial.

$C_2$ : Control de Tween – 80 y etanol.

$C_3$ : Control de aceite esencial.

$d_{1-13}$ : Diluciones seriadas.

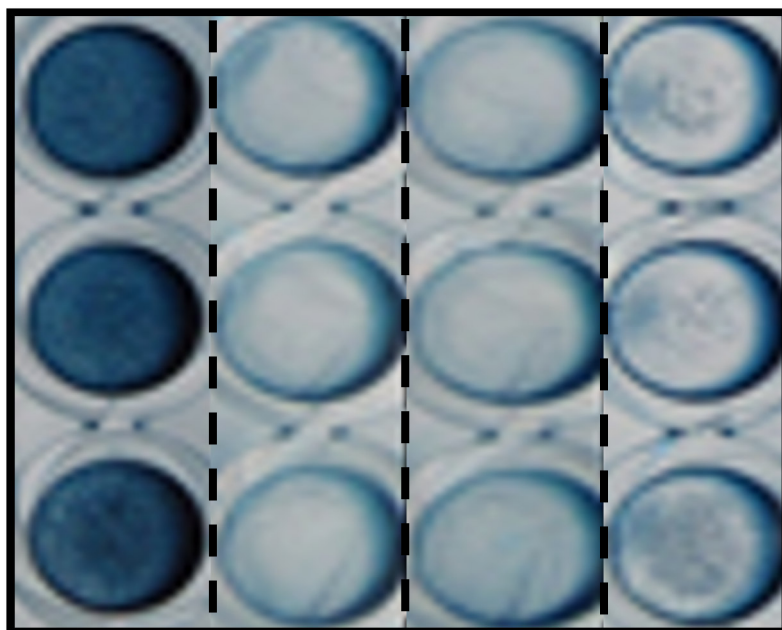


Fig. 21 – b1: De izquierda a derecha: Representan los pozos de control de células C6/36 (CC); Control de tween – 80, etanol y aceite esencial ( $C_1$ ); Control de tween – 80 y etanol ( $C_2$ ); y Control de aceite esencial ( $C_3$ ); respectivamente.

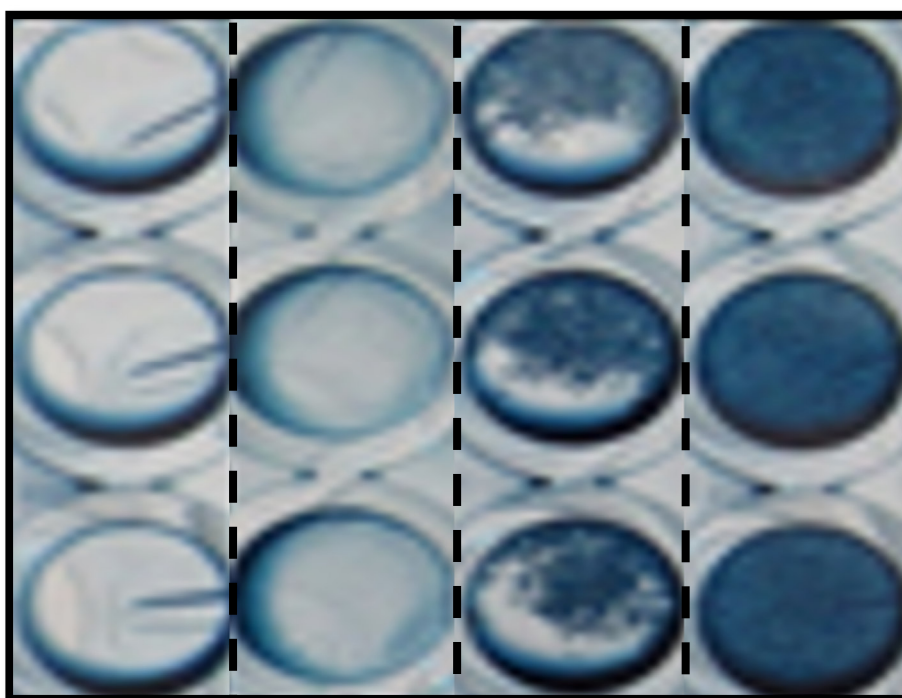


Fig. 21- b2: De izquierda a derecha: Pozos citotóxicos (1<sup>era</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>era</sup> columna) y no citotóxico en C6/36 (4<sup>ta</sup> columna).

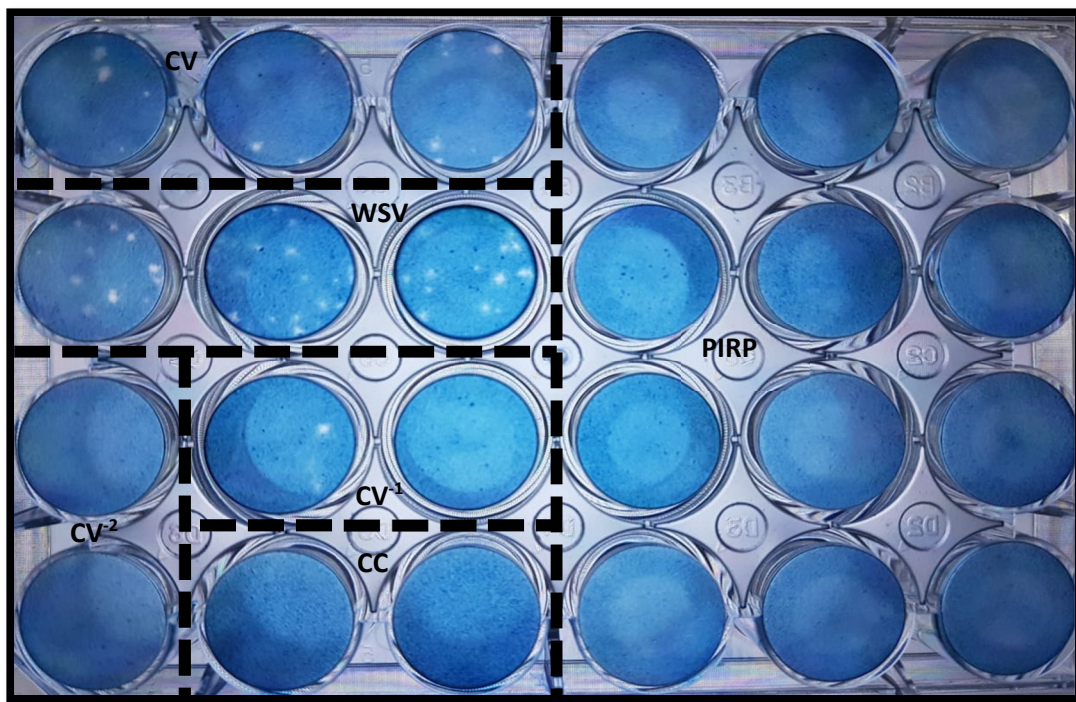


Fig. 22: Prueba de Inhibición de Reducción de Placas del aceite esencial contra ZIKV en la línea celular VERO – 76: En esta placa de cultivo celular la mezcla tween – 80, etanol y aceite esencial se enfrentó contra ZIKV; inhibiéndolo en un 100%.

CC: Control de células.

WSV: Working Solution Viral.

CV: Control de Virus.

CV<sup>-1</sup>: Dilución 1:10 del CV.

CV<sup>-2</sup>: Dilución 1:10 del CV<sup>-1</sup>.

PIRP: Prueba de Inhibición de Reducción de Placas



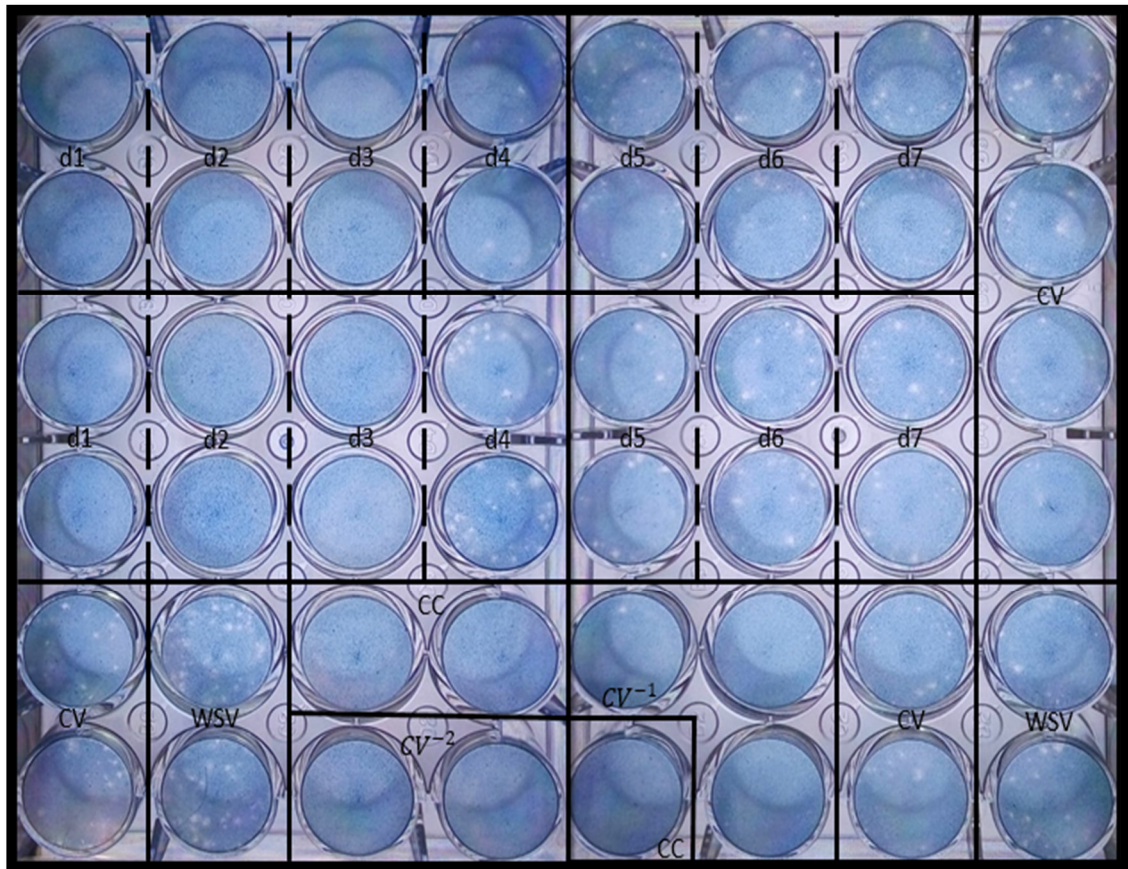


Fig. 23: Evaluación de la prueba de inhibición de reducción de placas de la mezcla 2 con tween – 80, etanol y aceite esencial (superior) y la mezcla 1 con tween – 80 y etanol (inferior) contra ZIKV.

CC: Control de células.

WSV: Working Solution Viral.

CV: Control de Virus.

CV<sup>-1</sup>: Dilución 1:10 del CV.

CV<sup>-2</sup>: Dilución 1:10 del CV<sup>-1</sup>.

d<sub>n</sub>: diluciones

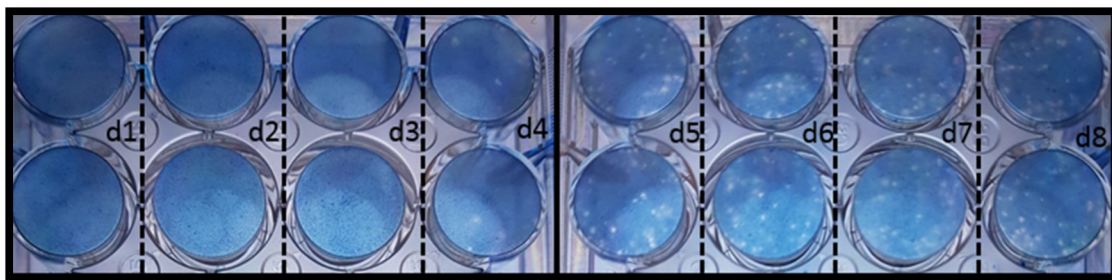


Fig.23.1: Diluciones sucesivas de 1:10 de la mezcla tween 80, etanol y aceite esencial de *Lippia alba* para inhibición contra ZIKV.

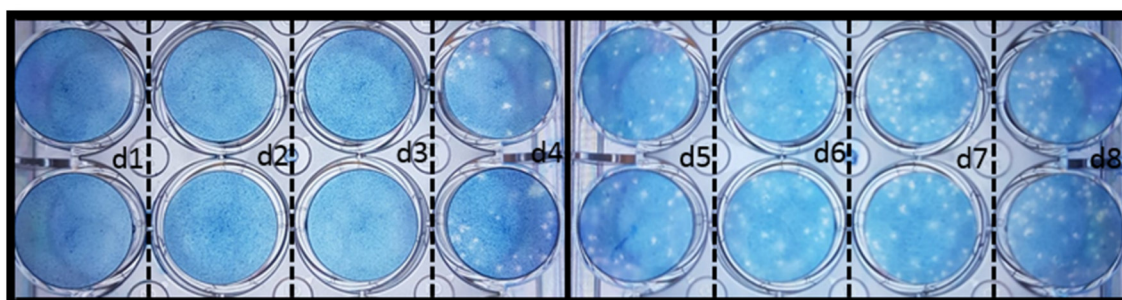


Fig. 23.2: Diluciones sucesivas de 1:10 de la mezcla tween 80 y etanol para la inhibición contra ZIKV.

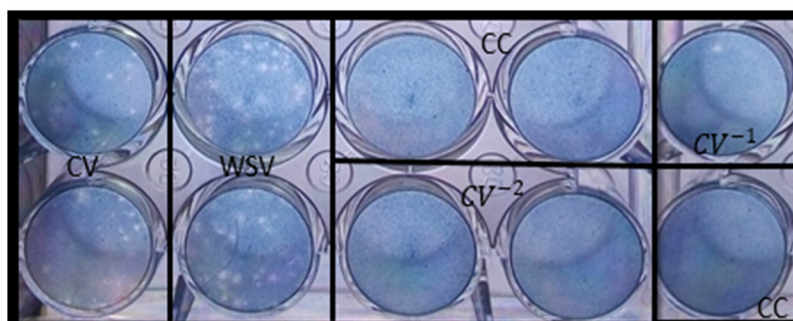


Fig. 23.3: Pozo de CC, WSV, CV, CV<sup>-1</sup> y CV<sup>-2</sup>.

**b. Tablas:**

**b.1. Preparación de reactivos**

Tabla 9: Fórmula de preparación del medio de crecimiento con pH= 6.9.

Reactivo	Cantidad	Unidades
Medio Mínimo Esencial con sales Haks (E – MEM)	10.63	g/L
Bicarbonato de Sodio	0.35	g/L
Aminoácido No esenciales 100x	1	%
Piruvato de Sodio 100x	1	%
L- Glutamina 100x	1	%
Antibiótico y Antimicótico 100x	1	%
Suero Bovino Fetal	5-10	%
Hepes	1	%
Agua bidestilada	1	L

Tabla 10: Fórmula de preparación del medio de mantenimiento con pH= 6.9.

Reactivo	Cantidad	Unidades
Medio Mínimo Esencial con sales Earles (E-MEM)	9.526	g/L
Bicarbonato de Sodio	2.2	g/L
Aminoácido No Esenciales 100x	1	%
Piruvato de Sodio 100x	1	%
L- Glutamina 100x	1	%
Antibiótico y Antimicótico 100x	1	%
Suero Bovino Fetal	2-5	%
Hepes	1	%
Agua Destilada	1	L

Tabla 11: Fórmula de preparación del overlayer (medio semisólido) con pH= 6.9.

Reactivos	Cantidad	Unidades
Suero Bovino Fetal	10	ml
L-Glutamina	1	ml
Antibiótico	1	%
MEM sin rojo fenol	100	ml
CMC 3% estéril	50	ml

Tabla 12: Fórmula de preparación del overlayer (medio sólido) **con** pH = 6.9.

Reactivos	Cantidad	Unidades
Suero Bovino Fetal	10	ml
L – Glutamina	1	ml
Antimicótico	1	%
MEM - sin rojo fenol	100	ml
Agarosa 2%	50	ml